

Molekulare Charakterisierung einer in *Escherichia coli* exprimierten cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen

Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von
Dipl. Biol. Monika Burg
geboren am 03.12.1965
in Bad Oeynhausen

2001

-
1. Gutachter: Privatdozent Dr. J. Müthing
 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hinssen

Vorbemerkungen:

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von April 1995 bis Februar 2001 am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld (Leitung Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann) unter der Anleitung von Herrn Hochschuldozent Dr. J. Müthing angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann, dem Leiter des Lehrstuhls für Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, seine vielfältige Unterstützung sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herrn Hochschuldozent Dr. J. Müthing danke ich für die intensive Betreuung der Arbeit und seine konstruktive Diskussionsbereitschaft. Auch für seine Unterstützung bei der Erstellung von Veröffentlichungen und für seine fachliche Beratung möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Hinssen danke ich für seine Bereitschaft, sich als Zweitgutachter aus der Fakultät für Biologie zur Verfügung zu stellen.

Herrn Prof. Dr. H. Ragg, dem Leiter der AG Zelluläre Genetik der Technischen Fakultät, danke ich für die Möglichkeit, die molekularbiologischen Arbeiten in seinem Labor durchführen zu können. Herrn Dr. P. B. Kamp, Frau Dipl. Chem. U. Schmidt und Herrn Dipl. Biol. S. Brinkmeyer danke ich für die fachliche Beratung, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei den PCR- und Klonierungsexperimenten.

Herrn Prof. Dr. E. Flaschel, dem Leiter des Lehrstuhls für Fermentationstechnik der Technischen Fakultät, danke ich für die Bereitstellung der Fermentationsanlage. Herrn Chem. Ing. T. Schäffer möchte ich für seine Hilfe und seine Mitarbeit bei der Durchführung der Fermentationen danken.

Für die fachliche Beratung und die Unterstützung bei der Proteinaufreinigung möchte ich mich bei Herrn Dr. D. Lütkemeyer bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Frey, dem Leiter der Abteilung für Biochemie der Fakultät für Chemie, möchte ich mich für das Überlassen der pGEX Vektoren bedanken. Frau Dr. P. Budde danke ich für die Hilfe bei der Herstellung kompetenter Zellen.

Für die Bereitstellung der pQE-Vektoren und der *E. coli* M15 pREP4 Zellen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Jockusch, dem Leiter des Lehrstuhls für Entwicklungsbiologie der Fakultät für Biologie, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. D. Vullhorst und Frau Dr. K. Remmert für die ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei Klonierungs- und Aufarbeitungsfragen.

Bei Frau Dipl. Chem. R. Lümen und Herrn Dipl. Biol. A. Werner möchte ich mich für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung, durch ein Stipendium des Graduiertenkollegs „Zelluläre Grundlagen Biotechnischer Prozesse“ und die damit verbundene Möglichkeit Ergebnisse auf Kongressen präsentieren zu können, danke ich der DFG. Dem Sprecher des Graduiertenkollegs Prof. Dr. R. Eichenlaub, Leiter des Lehrstuhls für Gentechnologie / Mikrobiologie der Fakultät für Biologie, danke ich für sein Engagement bei der wissenschaftlichen Förderung der Stipendiaten. Mein besonderer Dank gilt Frau B. Obasohan, Sekretärin des Graduiertenkollegs, für ihre Hilfe bei organisatorischen Fragen.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zellkulturtechnik und der AG Zelluläre Genetik der Technischen Fakultät möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit, die vielen Gespräche und die gute Atmosphäre danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Freund und meinen Freunden für ihre mentale Unterstützung, rückhaltlose Zuwendung und für ihr Verständnis.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind vorab wie folgt publiziert bzw. zur Veröffentlichung eingereicht worden:

Burg, M., Müthing, J. (1998),

Cloning and expression of a cytosolic sialidase from CHO cells in a glutathione S-transferase (GST)-encoding expression vector,

O.-W. Merten, New Developments and New Applications in Animal Cell Technology, S. 175-179, Kluwer Academic Publishers

Burg, M., Müthing, J. (1998),

Cloning of a cytosolic sialidase from CHO cells and expression of a soluble and active glutathione S-transferase (GST)-sialidase fusion protein in E. coli,

Poster, International GlycoBioTechnology Symposium 98, Braunschweig

Burg, M., Müthing, J. (1998),

Production and purification of a CHO cell derived cytosolic sialidase cloned as glutathione S-transferase (GST)-sialidase fusion protein in E. coli,

Poster und Vortrag, 10th Joint Meeting of the „Netherlands Society for Glycobiology“, „Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie“ und der „Groupe Lillois de Glycobiologie“, Nuland

Burg, M., Schäffer, T., Müthing, J. (1999)

Biotechnical production and purification of a mammalian sialidase as glutathione S-transferase fusion protein,

Poster, Dechema-Jahrestagung 1999, Wiesbaden

Burg, M., Müthing, J. (2000)

Ganglioside-hydrolyzing specificity of a cytosol-derived sialidase from Chinese hamster ovary cells,

Poster, 20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg

Burg, M., Müthing, J. (2001)

Characterization of cytosolic sialidase from Chinese hamster ovary cells: I. Cloning and expression of soluble sialidase in Escherichia coli,

Carbohydr. Res., im Druck

Müthing, J., Burg, M. (2001)

Characterization of cytosolic sialidase from Chinese hamster ovary cells: II. Substrate specificity for gangliosides,

Carbohydr. Res., im Druck

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Biotechnologische Bedeutung rekombinanter Glykoproteine aus tierischen Zellen für die ... Humantherapie	1
1.2	Produktion rekombinanter Glykoproteine mit Säugerzellen.....	2
1.2.1	Produktglykosylierung in Säugerzellen	4
1.2.1.1	Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen aus Säugerzellen.....	4
1.2.1.2	Funktion terminaler Sialinsäuren	6
1.2.2	Rekombinante humane Glykoproteine aus CHO-Zellen	7
1.3	Produktintegrität und Produktqualität	9
1.3.1	Unterschiede in der Glykosylierung nativer humaner und rekombinanter Glykoproteine aus CHO-Zellen.....	10
1.3.2	Bedeutung von Glykosidasen für die Produktglykosylierung.....	10
1.3.3	Sialidasen in Produktionsprozessen	12
1.4	Cytosolische Sialidase aus CHO-Zellen	13
1.5	Molekularbiologische Methoden	15
1.5.1	Klonierung und Transformation von <i>E. coli</i>	16
1.5.2	Expression von Fusionsprodukten in <i>E. coli</i>	17
1.6	Arbeitsziele	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Kultivierung von CHO-Zellen	21
2.1.1	Zelllinien	21
2.1.2	Kultivierung der CHO-Zellen zur RNA-Isolierung	21
2.2	RNA-Isolierung aus CHO-Zellen	24
2.2.1	Gesamt-RNA Gewinnung nach CHOMCZYNSKI AND SACCHI.....	24
2.2.2	Gesamt-RNA Gewinnung mit dem RNeasy Total RNA Kit.....	25
2.2.3	Photometrische Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA.....	26
2.2.4	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese	26
2.3	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT PCR)	28
2.3.1	Reverse Transkription	29
2.3.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	30
2.3.3	DNA-Agarosegelelektrophorese	34

Inhalt

2.4	Subklonierung mit dem Original TA Cloning Kit	35
2.4.1	Ligation mit dem pCR 2.1 Vektor	36
2.4.2	Transformation von <i>E. coli</i> Inf α F' mit den Ligationsprodukten	37
2.4.3	Überprüfung der Transformation	38
2.4.3.1	Plasmidisolierung mit Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit.....	38
2.4.3.2	Restriktionsanalyse	39
2.5	Klonierung der Sialidase cDNA in Expressionsvektoren	40
2.5.1	Das QIAexpress System	40
2.5.2	Das GST Gene Fusion System	42
2.5.3	Herstellung der Vektoren	43
2.5.3.1	Plamidisolierung mittels Alkalische Lyse.....	43
2.5.3.2	Reinigung und Anreicherung der Plasmide durch DNA-Fällung mit Ethanol	44
2.5.3.3	Restriktion der Plasmide mit Endonukleasen	45
2.5.3.4	Dephosphorylierung und RNase-Behandlung.....	45
2.5.3.5	Aufreinigung der Expressionsvektoren mit dem QIAgen Gel Extraction Kit.....	46
2.5.4	Bereitstellung des Inserts.....	46
2.5.4.1	Restriktion der Plasmidisolierungen der <i>E. coli</i> Inf α F' Subklone	47
2.5.4.2	Auftrennung und Isolierung der Sialidase cDNA-Fragmente	47
2.5.5	Ligation der Sialidase cDNA-Fragmente mit den Expressionsvektoren.....	47
2.5.6	CaCl ₂ Transformation von <i>E. coli</i> M15 pREP4 Zellen	49
2.5.6.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	49
2.5.6.2	Transformation von <i>E. coli</i> M15 pREP4 Zellen mit den Ligationsprodukten	50
2.5.7	Nachweis und Isolierung der transformierten Klone	51
2.5.7.1	Kolonie-PCR	51
2.5.7.2	Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse.....	51
2.6	Kultivierung der Klone, IPTG-Induktion und Herstellung bakterieller Lysate	51
2.6.1	Induktion der Transformanden mit IPTG	51
2.6.2	Kultivierung der <i>E. coli</i> M15 pREP4 Klone	52
2.6.2.1	Small-scale Kultivierung (1-10 ml Kulturvolumen)	52
2.6.2.2	Kultivierung im Schüttelkolben (250-1000 ml Kulturvolumen).....	52
2.6.2.3	Kultivierungen im Bioreaktor (25 Liter Kulturvolumen)	53
2.6.3	Herstellung bakterieller Lysate.....	55
2.6.3.1	Zellaufschluß von small-scale Kultivierungen.....	55
2.6.3.2	Zellaufschluß von Schüttelkolbenkulturen	55
2.6.3.3	Zellaufschluß des Fermentationskonzentrats	55
2.7	Expressionsanalytik	56
2.7.1	Expressionsanalyse mit Gesamtproteinextrakten.....	56

Inhalt

2.7.1.1	Herstellung der Extrakte.....	56
2.7.2	SDS-PAGE.....	56
2.7.3	Nachweis der rekombinanten cytosolischen Sialidase.....	57
2.7.3.1	Nachweis der Sialidaseaktivität	58
2.7.4	Proteinbestimmung nach Bradford.....	59
2.7.5	Immunoblot	60
2.8	Aufreinigung der rekombinanten cytosolischen CHO-Sialidase aus <i>E. coli</i> Zellen.....	63
2.8.1	Affinitätsaufreinigung mit Nickel NTA Agarose	63
2.8.2	Affinitätsaufreinigung mit Glutathion Sepharose 4B	65
2.8.2.1	Affinitätsreinigung des Fusionsproteins aus small-scale Kulturen	65
2.8.2.2	Affinitätsaufreinigung des Fusionsproteins aus Schüttelkolbenkulturen mittels	
	Säulenchromatographie	67
2.8.2.3	Säulenchromatographische Affinitätsaufreinigung des Fusionsproteins aus der	
	Fermentation im Bioreaktor.....	67
2.8.2.4	Thrombinverdau von GST-Fusionsproteinen	68
2.8.3	Ionenaustauschchromatographie	68
2.8.4	Gelfiltration	69
2.9	Charakterisierung der GST-Sialidaseaktivität	70
2.9.1	Sialidase-Inhibitoren	70
2.9.2	Untersuchung der Sialidaseaktivität mit Gangliosiden aus humanen Granulozyten.....	70
2.9.2.1	Analytische Trennung durch Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie	71
2.9.2.2	Gangliosiddetektion mittels Overlay-Technik nach vorherigem Enzymabbau	71
2.9.2.2.1	Plexigum-Beschichtung der HPTLC-Platten.....	72
2.9.2.2.2	Overlay-Assay mit vorgeschaltetem Enzymabbau	72
2.9.2.3	Gangliosiddetektion mit Resorcin	74
2.10	Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen GST-Sialidase	74
2.10.1	Vorbereitung des Antigens	74
2.10.2	Immunisierung eines Huhns mit gereinigter GST-Sialidase	75
2.10.3	Spezifitätsnachweis der Immunsereen gegen GST-Sialidase	75
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	76
3.1	Klonierung der cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen	79
3.1.1	RNA-Isolierung aus CHO-Zellen	79
3.1.2	Entwicklung einer RT PCR Methode	81
3.1.3	Subklonierung der Sialidase cDNA RT PCR-Produkte in den Vektor pCR 2.1	88
3.1.4	Klonierung der Sialidase cDNA-Fragmente in Expressionsvektoren.....	94

Inhalt

3.1.4.1	Klonierung des <i>Bgl</i> II- <i>Bgl</i> II Fragments in die Expressionsvektoren pQE16 und pQE60...	96
3.1.4.2	Klonierung des <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragments in den Expressionsvektor pQE31	98
3.1.4.3	Klonierung des <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI Fragments in den GST Expressionsvektor pGEX-2T...	99
3.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	100
3.2	Expression der rekombinanten cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen in <i>E. coli</i>	102
3.2.1	Expressionsanalyse mit den Klonen pQE31-E-04 und pQE31-E-10.....	103
3.2.1.1	SDS-PAGE von Lysaten des Klon pQE31-E-04 nach	
	Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung	104
3.2.1.2	Bestimmung der Sialidaseaktivität in Lysaten der Klone pQE31-E-04 und	
	pQE31-E-10	106
3.2.2	Expressionsanalyse der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2	106
3.2.2.1	SDS-PAGE der Gesamtproteinextrakte aus den Klonen pGEX-2T-S1 und	
	pGEX-2T-S2	107
3.2.2.2	SDS-PAGE der Glutathion Sepharose 4B affinitätsgereinigten GST-Sialidase aus	
	Lysaten der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2	108
3.2.2.3	Bestimmung der Sialidaseaktivität in Lysaten der Klone pGEX-2T-S1 und	
	pGEX-2T-S2	110
3.2.3	Zusammenfassung der Expressionsanalysen	111
3.3	Optimierung der Induktionsparameter zur Produktion der löslichen, aktiven GST-Sialidase mit dem Klon pGEX-2T-S1.....	113
3.3.1	Einfluß der Induktionstemperatur auf die Expression	113
3.3.2	Einfluß der Induktionsdauer auf die Expression	114
3.3.3	Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen.....	115
3.3.4	Induktion bei verschiedenen Zelldichten.....	117
3.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	118
3.4	Kultivierung des Klon pGEX-2T-S1 im 250 ml und im 25 Liter Maßstab.....	120
3.4.1	Wachstumskurven aus parallelen Schüttelkolben-ansätzen des Klon pGEX-2T-S1 im	
	250 ml Kulturmaßstab	120
3.4.2	Wachstumsverläufe der Fermentationen 1 und 2 des Klon pGEX-2T-S1 im 25 Liter.....	
	Maßstab.....	121
3.5	Aufreinigung der GST-Sialidase	124
3.5.1	Beispiele für die Aufreinigung der GST-Sialidase aus Schüttelkolbenansätzen des Klon....	
	pGEX-2T-S1 im 250 ml und im 1 Liter Maßstab.....	124
3.5.1.1	Aufreinigung der GST-Sialidase aus einem 250 ml Schüttelkolben.....	124
3.5.1.2	SDS-PAGE der affinitätschromatographisch gereinigten GST-Sialidase aus einem	
	1 Liter Produktionsansatz	125

Inhalt

3.5.1.3	Elutionsprofil der GST-Sialidase Aufreinigung aus einem 1 Liter Produktionsansatz	126
3.5.2	Aufreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 und Fermentation 2 des Klon pGEX-2T-S1 im 25 Liter Maßstab	128
3.5.2.1	Affinitätsaufreinigung der GST-Sialidase aus der Fermentation 1 mit Glutathion Sepharose 4B	128
3.5.2.2	Affinitätsaufreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 2 mit Glutathion Sepharose 4B	130
3.5.3	Feinreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 mittels Q Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration	132
3.5.3.1	Feinreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 mittels Q Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie	132
3.5.3.2	Feinreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 mittels Gelfiltration	134
3.5.3.3	Zusammenfassung der Feinreinigung der GST-Sialidase	137
3.6	Charakterisierung der GST-Sialidase	139
3.6.1	Inhibitorische Wirkung von Neu5Ac und Neu5Ac2en	139
3.6.2	Charakterisierung der Sialidaspezifität mit Hilfe von Gangliosiden aus humanen Granulozyten	140
3.7	Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen GST-Sialidase	142
3.7.1	Präparation der GST-Sialidase Gelfiltrations-Fractionen	142
3.7.2	Immunisierung mit GST-Sialidase und Nachweis von Anti-GST-Sialidase Antikörpern in den Antiseren	143
3.7.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	146
4	ZUSAMMENFASSUNG	148
5	ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS	158
6	LITERATURVERZEICHNIS	161

1 Einleitung

1.1 Biotechnologische Bedeutung rekombinanter Glykoproteine aus tierischen Zellen für die Humantherapie

Die Entdeckung, Entwicklung und Produktion rekombinanter Proteine für therapeutische Anwendungen am Menschen war und ist ein wichtiger Bereich wissenschaftlicher und medizinischer Forschung.

Durch die Fortschritte der Molekularbiologie und der Biotechnologie in den letzten Jahrzehnten ist es heute möglich, nahezu jedes beliebige Protein zu produzieren [BERMAN AND LASKY, 1985]. Da Proteine die verschiedensten komplexen und spezifischen biologischen Funktionen erfüllen, eröffnet die moderne rekombinante DNA Technologie eine Fülle von neuen Einsatzmöglichkeiten für therapeutische Anwendungen in der Humanmedizin. Die rasante Entwicklung spiegelt sich auch in den Marktanalysen pharmazeutischer Produkte wider. Der Anteil rekombinanter Produkte am gesamten Weltmarkt für Pharmazeutika ist zwischen 1985 und 2000 von 1 auf 17 % gestiegen und betrug im Jahr 2000 bereits 42,5 Milliarden US Dollar (Abbildung 1).

Bei den meisten in der Humantherapie eingesetzten rekombinanten Proteinen handelt es sich um Glykoproteine aus Säugerzellen. Ausgehend von einem relativ kleinen Einsatzbereich, der hauptsächlich die Impfstoffproduktion betraf, ist der Einsatz von Säugerzellen zur Herstellung rekombinanter Biopharmazeutika enorm gestiegen. Den Hauptanteil medizinisch eingesetzter rekombinanter Produkte bilden heute rekombinante Glykoproteine aus tierischen Zellen [JENKINS, 1999]. Daher ist die Entwicklung kostengünstiger Produktionsprozesse, die die biologische Synthese von Glykoproteinen im großen Maßstab sicherstellen, eine der Hauptaufgaben der biotechnologischen Industrie [WARNER, 1999].

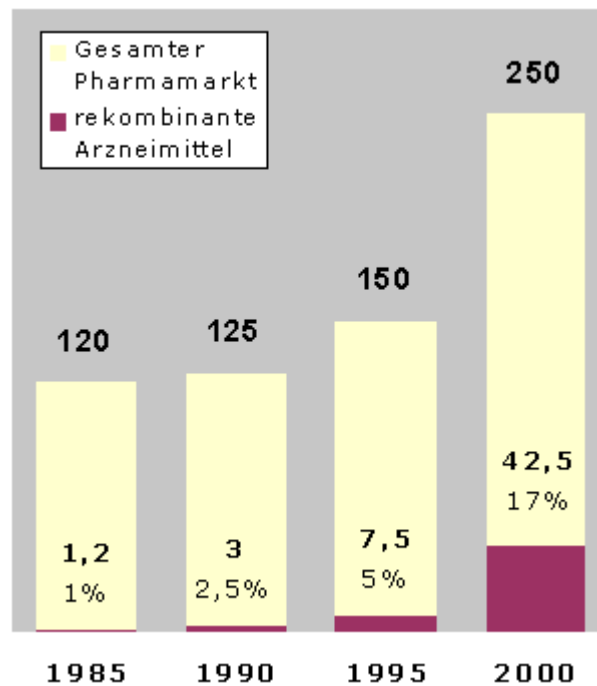


Abbildung 1: Weltmarkt für rekombinante Therapeutika in Milliarden US Dollar [INFORMATIONEN SEKRETARIAT BIOTECHNOLOGIE (ISB), 2001].

1.2 Produktion rekombinanter Glykoproteine mit Säugerzellen

Rekombinante humane Proteine können in Bakterien, Hefen, Pflanzen, Insekten- oder Säugerzellen kloniert und exprimiert werden. Der Einsatz von Bakterien, wie z. B. *E. coli*, führt jedoch häufig zu signifikanten Fehlfaltungen des produzierten Proteins. Außerdem werden rekombinante Proteine in der Regel posttranslational modifiziert, z.B. sind humane Serumproteine häufig glykosyliert. Die Glykosylierung von Proteinen erfolgt bei eukaryonten Zellen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgiapparat. Bei Prokaryonten fehlt ein vergleichbarer Glykosylierungsapparat, so daß rekombinante Proteine nicht korrekt modifiziert werden können. Hefen, Pflanzen- und Insektenzellen sind zwar in der Lage, Proteine mit Oligosaccharidstrukturen zu versehen, diese unterscheiden sich jedoch sehr von den Glykosylierungsmustern nativer Proteine [JENKINS et al., 1996]. Die Produktion mit Hefen oder Insektenzellen führt z.B.

zu terminalen Mannoseresten an den Oligosaccharidstrukturen rekombinanter Proteine. Solche Proteine haben eine vergleichsweise kurze Verweilzeit im Blutkreislauf und werden in der Leber sehr schnell abgebaut [PAULSON, 1989b].

Säugerzellen besitzen dagegen einen Glykosylierungsapparat, der weitgehend einheitliche Glykosylierungsmuster synthetisiert. Die Glykosylierung, d.h. das Anhängen von Zuckerketten an ein Polypeptid, gehört zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen in Säugerzellen. In Abbildung 2 sind Beispiele der am häufigsten vorkommenden N-Glykosylierungen, d.h. Glykosylierungen von Asparaginresten des Proteins, in unterschiedlichen Spezies dargestellt.

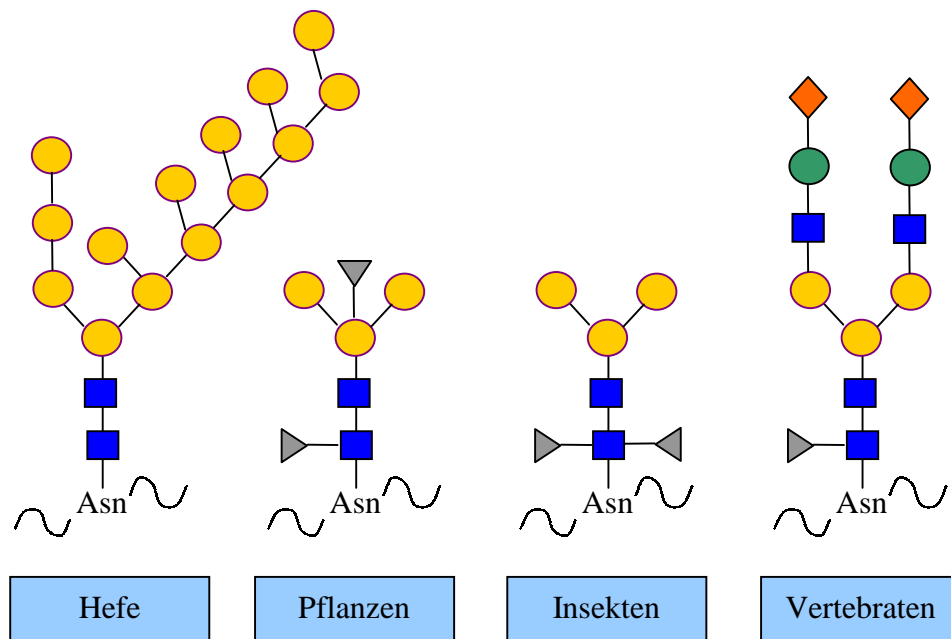


Abbildung 2: Beispiele der häufigsten N-Glykosylierungen in unterschiedlichen Spezies [modifiziert nach VARKI et al., 1999a]. ■, N-Acetyl-Glukosamin; ●, Mannose; ▼, Fucose; ●, Galaktose; ◆, N-Acetyl-Neuraminsäure.

1.2.1 Produktglykosylierung in Säugerzellen

Oligosaccharidketten an Glykoproteinen können vielfältige Funktionen erfüllen [CUMMING, 1991, VARKI, 1993]. Kohlenhydratkomponenten spielen eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung, der Bildung oligomerer Strukturen und der Sekretion und Stabilität rekombinanter Produkte [BERMAN AND LASKY, 1985]. Sie beeinflussen die Verweildauer von Glykoproteinen im Blutkreislauf [ASHWELL AND HARFORD, 1982], können die biologische Aktivität der Substanzen verändern [DARRELL, 1992] und sind an verschiedensten biologischen Signalwirkungen [PAULSON, 1989] und regulatorischen Prozessen beteiligt. Außerdem können bestimmte Oligosaccharidstrukturen antigene Wirkungen haben [FEIZI AND CHILDS, 1987].

1.2.1.1 Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen aus Säugerzellen

Es gibt zwei Typen Protein-gebundener Glykane. Asparagin-gebundene Oligosaccharidstrukturen werden als N-Glykane bezeichnet, Serin- und Threonin-gebundene Oligosaccharidketten als O-Glykane [KORNFELD AND KORNFELD, 1985].

Als potentielle N-Glykosylierungsstelle eines Proteins dient die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr, wobei X für jede beliebige Aminosäure außer Prolin stehen kann. Alle N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidseitenketten besitzen dieselbe Kernstruktur, die entweder mit Oligomannose (High-Mannose-Typ), mit komplexen Oligosaccharidketten aus N-Acetyl-Neuraminsäure, Galaktose, N-Acetyl-Glukosamin, Mannose und Fukose (Komplex-Typ) oder einer Mischung aus beiden Strukturen (Hybrid-Typ) verknüpft sein kann [JENKINS et al., 1996].

Das Vorhandensein der Konsensussequenz bedeutet nicht zwangsläufig, daß eine Glykosylierung vorliegt. Tatsächlich sind in der Regel nur ca. ein Drittel aller N-Glykosylierungsstellen sekretierter Glykoproteine glykosyliert [SPELLMAN, 1990].

Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen eines Proteins können vollständig, teilweise oder gar nicht glykosyliert sein. Auch kann eine bestimmte N-Glykosylierungsstelle mit unterschiedlichen Oligosaccharidvarianten besetzt sein [PAREKH AND PATEL, 1992].

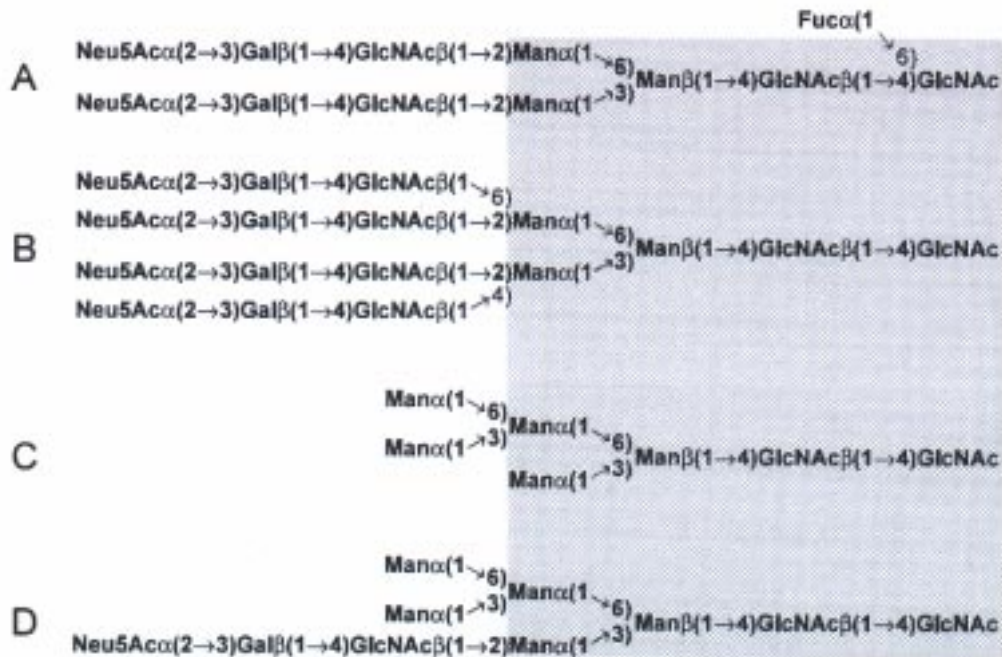


Abbildung 3: N-glykosidische Kernstruktur (grau unterlegt) und repräsentative Oligosaccharidseitenketten von Glykoproteinen. A, Komplex-Typ (disialobiantennär); B, Komplextyp (tetrasialo-tetraantennär); C, High-Mannose-Typ; D, Hybrid-Typ. Man: Mannose, GlcNAc: N-Acetyl-Glukosamin, Gal: Galaktose, Fuc: Fukose, Neu5Ac: N-Acetyl-Neuraminsäure.

Diese unterschiedlichen Glykosylierungsvarianten führen zu einer Reihe von Glykoformen oder Isoformen eines Proteins [DWEK et al., 1993].

Das Auftauchen verschiedener Glykovarianten wird als Mikroheterogenität von N-Glykosylierungen bezeichnet [VARKI et al., 1999b]. Die Mikroheterogenität ist abhängig vom Zelltyp und vom physiologischen Status der produzierenden Zelle [CUMMING, 1991].

O-gebundene Oligosaccharide tragen in der Regel eine N-Acetyl-Galaktose (GalNAc) an der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin, die als Basis für die Bindung weiterer Zucker dient. Diese Zuckerstrukturen können aus nur einem Zucker [HARRIS et al., 1991], kleinen Seitenketten oder sehr komplexen Strukturen bestehen. Proteoglykane besitzen vornehmlich O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide. Die für N-Glykane beschriebene Mikroheterogenität tritt auch bei O-Glykosylierungsstellen auf [DWEK et al., 1993]. Allgemein lassen sich O-Glykane in Gruppen einteilen, die auf fünf

verschiedenen Kernstrukturen basieren. Die Kettenverlängerung erfolgt wie auch bei N-Glykanen durch Wiederholungen von Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3)-Motiven, die mit unterschiedlichen endständigen Zuckern versehen sind. Verzweigte Ketten entstehen durch die Anbindung des Wiederholungsmotivs an Galaktosereste [PAULSON, 1989b].

1.2.1.2 Funktion terminaler Sialinsäuren

Sowohl O-Glykane als auch N-Glykane besitzen häufig endständige Sialinsäurereste. Als Sialinsäuren werden verschiedene Neuraminsäure-Derivate bezeichnet. Dabei handelt es sich um C9-Zucker in Pyranoseform mit substituierter Aminogruppe. In der Regel sind Acetyl- oder Glykolyreste an die Aminogruppe der Neuraminsäure gebunden. Die Hydroxylgruppen können methyliert oder mit Acetyl-, Laktyl-, Sulfat- oder Phosphatgruppen verestert sein. Proteine aus menschlichen Zellen und aus Hühnern tragen ausschließlich N-Acetyl-Neuraminsäuren (Neu5Ac) [VARKI, 1992], während bei Proteinen aus anderen Vertebraten sowohl N-Acetyl- als auch N-Glykoly-Neuraminsäuren (Neu5Gc) zu finden sind. Die ausgeprägte negative Ladung von Sialinsäuren (der pK-Wert liegt bei pH 2) und ihr Vorkommen in verschiedensten gewebespezifischen Strukturen impliziert ihre Beteiligung an zellulären Prozessen. In der Tat führt eine enzymatische Entfernung der Sialinsäurereste zu erheblichen Veränderungen der biologischen Eigenschaften von Zellen und Molekülen [REUTER, 1982, JANOSI, 1999]. Desialylierte Serumproteine haben gegenüber der nativen Form vergleichsweise kurze Verweilzeiten im Blutkreislauf, da ein spezifischer Rezeptor auf Hepatozyten durch Erkennung der endständigen Galaktosereste die Entfernung der Proteine aus dem Blutkreislauf vermittelt [ASHWELL AND HARFORD, 1982].

Es lassen sich fünf Hauptfunktionen von Sialinsäuren unterscheiden [SCHAUER, 1985].

Sialinsäuren

- erfüllen durch ihre negative Ladung wichtige Funktionen bei der Bindung und dem Transport positiv geladener Substanzen und der Aggregation bzw. Disaggregation von Zellen,
- beeinflussen die Konformation von Glykoproteinen und damit auch deren Aktivität oder Ausrichtung in der Membran,
- können als antigene Determinanten fungieren,
- sind essentielle Komponenten von Rezeptoren,
- können die Erkennung spezifischer Rezeptoren oder Antigenbindungsstellen verhindern (Maskierungsfunktion).

1.2.2 Rekombinante humane Glykoproteine aus CHO-Zellen

Rekombinante Glykoproteine werden häufig in Chinese hamster ovary (CHO)-Zellen produziert. Die genetische Manipulation dieser Zellen ist unproblematisch und sie lassen sich als Suspensionskulturen in größerem Maßstab kultivieren. Der Hauptgrund für den Einsatz von CHO-Zellen ist, daß die Glykosylierung des rekombinanten Produkts weitgehend der des nativen humanen Proteins entspricht.

Beispiele einiger wichtiger rekombinanter Glykoproteine aus CHO-Zellen, ihre Eigenschaften und Glykosylierungen sind im folgenden aufgeführt:

Antithrombin III (AT III):

AT III ist ein Plasmaglykoprotein, das in der Leber synthetisiert wird. Es gehört zur Gruppe der Serinprotease-Inhibitoren und gilt als Hauptregulator von Thrombin und verschiedenen anderen Koagulations-Faktoren [TEIGE et al., 1994]. In der Medizin wird AT III zur postoperativen Thromboseprophylaxe, bei Leber- und Nierenerkrankungen oder bei septischem Schock eingesetzt. Das monomere Protein besteht aus 432 Aminosäuren und besitzt vier potentielle N-Glykosylierungsstellen.

Tissue plasminogen activator (t-PA):

Der Tissue plasminogen activator (t-PA) ist an der Fibrinolyse beteiligt. Das Protein besitzt vier potentielle Glykosylierungsstellen. Es gibt zwei verschiedene natürlich vorkommende Glykoformen des Proteins. Ein Protein ist an drei, das andere an zwei Stellen glykosyliert [PAREKH et al., 1989].

Erythropoietin (rhEPO):

Rekombinantes humanes Erythropoietin (rhEPO) wird klinisch zur Wachstumsstimulierung von roten Blutkörperchen verwendet. Das Protein besitzt drei potentielle N- und eine O-Glykosylierungsstelle. Die Kohlenhydratstrukturen des Proteins machen 40 % des Molekulargewichts von 36 kDa aus [WATSON et al., 1994]. Die Effektivität des Proteins ist abhängig von der Art der Glykosylierung [TAKEUCHI et al., 1989; BRIGGS et al., 1974].

Interferon γ (INF- γ):

Humanes Interferon γ ist ein Glykoprotein mit antiviraler, antiproliferativer und immunmodulatorischer Wirkung. Es besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen eine jeweils vollständig sialyliert vorliegt, die andere aufgrund sterischer Effekte nur teilweise sialyliert ist [GU AND WANG, 1997].

Interferon β 1 (INF- β 1):

Humanes rekombinantes Interferon β 1 (rhINF- β 1) besitzt antivirale Aktivität und wird in der Chemotherapie gegen Gehirntumore und Melanome eingesetzt. Das Protein besitzt eine potentielle N-Glykosylierungsstelle. Bei dem natürlichen Protein ist diese Glykosylierungsstelle zu 80 % mit biantennären Oligosacchariden vom Komplex-Typ besetzt [KAGAWA et al., 1988].

Leishmanolysin (GP63):

Leishmanolysin (GP63) ist das Hauptoberflächenprotein der parasitischen Protozoe *Leishmania* und ein potentieller Impfstoff-Kandidat. Es handelt sich um eine GPI-gebundene Metalloproteinase mit drei potentiellen Glykosylierungsstellen. CHO-Zellen wurden sowohl für die Expression von membranständigem GP63 als auch von GP63 als

sekretiertem Protein eingesetzt, wobei das membranständige Protein jedoch nicht vollständig sialyliert wird [MORRISON et al., 2000].

1.3 Produktintegrität und Produktqualität

Für den medizinischen Einsatz werden an rekombinante Proteine besondere Anforderungen gestellt [KOTHS, 1995]. Die Produktqualität ist für den therapeutischen Einsatz eines rekombinanten Glykoproteins ein entscheidendes Kriterium. In Bezug auf die Oligosaccharidstrukturen eines Proteins wird gefordert, daß das rekombinante Protein und das native Referenzprotein identisch sind und das Glykosylierungsmuster des rekombinanten Proteins keine Heterogenität zeigt [TEIGE et al., 1994]. Die vollständige Charakterisierung, und wenn möglich auch die Kontrolle der Glykosylierungsprofile humaner Glykoproteine für therapeutische Zwecke, sind dabei unabdingbar, da schon 1995 sowohl in den Vereinigten Staaten (USA) von der „Food and Drug Administration“ (FDA) als auch in Europa vom „Committee for Proprietary Medical Productions“ (CPMP) der Europäischen Union verstärkt eine umfassende Kohlenhydratanalyse aller neuen Glykoproteine für den Einsatz in der Humantherapie gefordert wurde [JENKINS AND CURLING, 1995]

Nicht nur der Zelltyp sondern auch die Kultivierungsbedingungen beeinflussen die Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen [SANTELL et al., 1999, YANG AND BUTLER, 2000]. Die Kohlenhydratanteile eines Proteins sind Produkte einer intrazellulären Prozessierung mit zelleigenen Glykosyltransferasen und Glykosidasen des Wirtsorganismus. Die Kontrolle und Steuerung dieser Prozessierung ist daher äußerst kompliziert [STANLEY, 1992].

1.3.1 Unterschiede in der Glykosylierung nativer humaner und rekombinanter Glykoproteine aus CHO-Zellen

Humane Glykoproteine und rekombinante Glykoproteine aus CHO-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Glykosylierung in einigen Punkten [JENKINS AND CURLING, 1995; JENKINS et al., 1996]:

- CHO-Zellen besitzen keine α 2,6-Sialyltransferase und können daher nur α 2,3-gebundene terminale Sialinsäurereste synthetisieren [PAULSON et al., 1989a].
- In CHO-Zellen ist keine Sulfatierung von N-Acetyl-Galaktoseresten möglich, die für einige Glykoprotein hormone von Bedeutung ist.
- CHO-Zellen fehlt eine α 1,3-Fukosyltransferase, so daß keine Fukosylierungen der produzierten Glykoproteine wie z.B. beim nativen TSH (Thyroid stimulating hormone) vorliegen.

Allerdings kann der Glykosylierungsapparat von CHO-Zellen durch gezielte Transformation mit den entsprechenden Glykosyltransferasen an das humane Glykosylierungsprofil angepaßt werden, z.B. durch die Transformation mit α 2,6-Sialyltransferase cDNA [LEE et al., 1989, MINCH, S. et al., 1995]. Außerdem wurden in den letzten Jahren eine Reihe von CHO-Klonen isoliert, die veränderte Glykosylierungseigenschaften besitzen und die Expression von Glykoproteinen mit minimaler Heterogenität garantieren [JENKINS AND CURLING, 1995].

1.3.2 Bedeutung von Glykosidasen für die Produktglykosylierung

Die Hauptaufgabe intrazellulärer Glykosidasen in eukaryonten Zellen ist die posttranslationale Modifikation von Glykoproteinen (trimming-Prozess). Eine Inhibition von Glykosidasen im Endoplasmatischen Reticulum (ER) kann die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur eines Glykoproteins verhindern oder den Transport von Proteinen aus dem ER blockieren [MOREMEN et al., 1994].

Bei Produktionsprozessen werden Glykosidasen bei der Zellyse freigesetzt und können das sekretierte Produkt angreifen. Im Gegensatz zur erwünschten posttranslationalen

Modifikation werden rekombinante Glykoproteine im Kulturüberstand durch Glykosidasen postsekretorisch modifiziert. Dieser Deglykosylierungsprozess im Kulturüberstand kann zu einer Verringerung der biologischen Aktivität der rekombinanten Glykoproteine und damit zu einer verminderten Wirksamkeit der Produkte führen [BERMAN AND LASKY, 1985, GEISOW, 1992, TAKEUCHI et al., 1989].

Insbesondere die Freisetzung von Sialidase führt durch die Entfernung der endständigen Sialinsäurereste zu einer Reduktion der biologischen Aktivität der produzierten Produkte. Studien bei unterschiedlichen pH-Werten haben gezeigt, daß Sialidase bei physiologischen pH-Werten (pH 7) in Zellkulturüberständen Aktivität zeigt [GRAMER AND GOOCHEE, 1993a und b] und sekretierte Glykoproteine desialyliert. Beispielsweise besitzt desialylierter t-PA *in vitro* eine gesteigerte biologische Aktivität, *in vivo* ist die Aktivität von asialo-t-PA dagegen erheblich reduziert [GEISOW, 1992]. In CHO-Zellen produziertes rhEPO liegt zunächst vollständig sialyliert vor [WATSON et al., 1994]. Veränderte Kulturbedingungen bei der Produktion von rhEPO in CHO-Zellen können jedoch eine Desialylierung des Proteins bewirken [YANG AND BUTLER, 2000]. Desialyliertes EPO besitzt *in vitro* eine gegenüber der sialylierten Form gesteigerte Aktivität [TAKEUCHI, et al., 1989], ist aber *in vivo* aufgrund von Abbaufunktionen der Leber weit weniger wirksam [LIU, 1992]. Bei rekombinanten Glykoproteinen zum Einsatz in der Humantherapie ist insbesondere die Verweildauer im Blutkreislauf ein entscheidendes Kriterium für die Wirksamkeit.

1.3.3 Sialidasen in Produktionsprozessen

Der Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Sialidaseaktivität im Kulturüberstand von CHO-Zellen und der Desialylierung von produziertem humanen, rekombinanten Antithrombin III (rhATIII) konnte in verschiedenen Studien [MUNZERT et al., 1996, 1997] nachgewiesen werden. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung von rhAT III aus CHO-Zellen mit den vier potentiellen Glykosylierungsstellen. Diese Glykosylierungsstellen können disialo-biantennäre Komplex-Typ Oligosaccharidstrukturen tragen, die durch Sialidase hydrolysiert werden können.

Ansätze zur Verringerung der Sialidaseaktivität in Kulturüberständen sind der Einsatz von Sialidaseinhibitoren oder einer CHO-Mutante mit geringerer Sialidaseaktivität [GRAMER et al., 1995] sowie das Einbringen von antisense RNA in CHO-Zellen

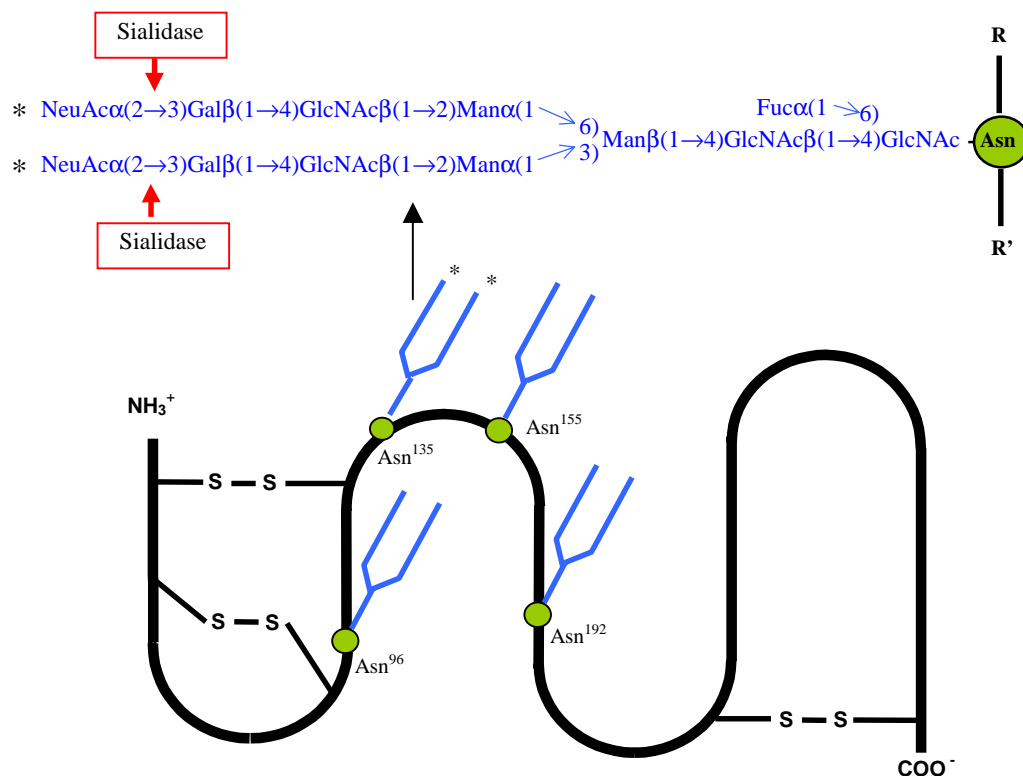


Abbildung 4: Schematisches Modell von rhATIII mit vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen (grün), die mit disialo-biantennären Komplex-Typ Oligosacchariden (blau) besetzt sind. Die hydrolytische Abspaltung der Sialinsäurereste erfolgt durch Sialidase (rote Pfeile).

[FERRARI et al., 1998]. Alle diese Maßnahmen führen jedoch nur zu einer verminderten Sialidaseaktivität und nicht zu einer vollständigen Vermeidung von Desialylierungsvorgängen.

1.4 Cytosolische Sialidase aus CHO-Zellen

Für die Prozessierung von Glykoproteinen aus CHO-Zellen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit eine lösliche Sialidase verantwortlich, die 1993 von WARNER et al. aus dem Kulturüberstand von CHO-Zellen isoliert werden konnte. Aus 100 Liter Kulturüberstand konnten 174 µg Sialidase isoliert werden. Es handelt sich um ein lösliches Enzym mit einem Molekulargewicht von 43 kDa, das bei pH-Werten zwischen 4,5 und 7,5 aktiv ist. Das Enzym ist in der Lage, sowohl freie Oligosaccharide als auch Ganglioside und Glykoproteine zu desialylieren. Die cDNA Sequenz wurde 1994 von FERRARI et al. veröffentlicht (Abbildung 5). Die Sequenz kodiert für ein einzelsträngiges Protein aus 379 Aminosäuren. Zwei Asp-Box-Sequenz-Motive konnten identifiziert werden. Das Motiv enthält 5-12 Aminosäurereste, von denen fünf, die um einen zentralen Aspartatrest angeordnet sind, hoch konserviert sind. Die Funktion dieses Motivs ist unbekannt. Der Sequenzvergleich mit einer aus Rattenleber isolierten Sialidase ergab 83 % Übereinstimmung [MIYAGI et al, 1993b]. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen bakterieller Sialidasen mit der Sialidase aus CHO-Zellen ergab keine signifikanten Primärsequenzhomologien. Ein 1999 von MONTI et al. identifiziertes humanes Sialidasegen zeigte 73,7 % Übereinstimmung mit der Sialidasesequenz aus CHO-Zellen. Da keine der Sialidasen aus Säugern eine Transmembrandomäne oder Signalsequenz besitzt ist anzunehmen, daß diese Enzyme im Cytosol lokalisiert sind. Des weiteren belegen immunohistochemische Untersuchungen, daß es sich bei der aus Rattenmuskel isolierten Sialidase um ein cytosolisches Enzym handeln muß [AKITA et al., 1997]. Die biochemische Aufreinigung cytosolischer Sialidasen aus CHO-Zellen [WARNER et al., 1993] oder Rattengewebe [MIYAGI AND TSUIKI, 1985, MIYAGI et al., 1990] ist sehr aufwendig, erfordert den Einsatz verschiedenster Chromatographiemethoden (z.B. Ionenaustausch-, Affinitäts-, Hydrophobe-Interaktionschromatographie und Gelfiltration) und führt, wie in Tabelle 1 dargestellt, zu sehr geringen Mengen an aufgereinigtem Protein.


```

1  cgggggatgg atcatctgca gggcctcggt taaaagtgag aaaagccggt cctcccttct
61  ccatttggat tacaagctca aagggactgc ttataacctg gaggaatgat ctccgtgctc
121  ccgggggggag cactgcccac agtacgtgca tagagaggct ttgagaggaa ttaagatctc
181  agggccatgg cgacttgccc tgtcctgcag aaggagacgc tattccagac aggagactat
241  gcttacagaa tcctgtctct gatctacctg tcaaagcaga agaccctgct ggcctttgcg
301  gaaaagcgtc tgaccaagac ggatgagcat gcagatttgt ttgtcctacg aagaggaagc
361  tacaatgcag acacccatca ggtccagtgg caagctgagg aggtggtgac ccaagcctac
421  ctggagggcc accgctccat gagcccatgt cttttgtatg acaagcagac aaggaccctt
481  ttccttttct tcctgctgtt ccgtgggcaa atatcagaac accaccagct ccagactggg
541  gttaatgtca cacggctatg ccacatcacc agtactgacc atgggaagac ctggagcgct
601  gtccaggacc ttacagatac caccattggc agcaccatc aggattgggc cacatttggc
661  gtgggtcctg ggcactgtct gcagctgcga aacacagctg ggagcctgct ggtccctgct
721  tatgcctatc ggaaacaacc ccctatccat gcacctgcc cctctgcctt ctgcttctc
781  agccatgacc atgggagcac atgggagctg ggccactttg tgtccagaa ctgctggag
841  tgccagggtg ctgaggttgg cactggcgct gagagggtgg tctatctcaa tgctaggagc
901  tgcctgggag ccagggtcca ggcacaaagt cctaacagtg gcctggattt ccaggacaac
961  caggtagtga gtaaacttgt agagcctccc aaaggctgcc atggaagtgt gattgctttc
1021  cccaacccca cctcaaaggc agatgcctta gatgtgtggc tgctctatac ccacctaca
1081  gactcccgga agaggaccaa cctgggtgtg tacctcaatc agaagccact ggacccacc
1141  acctggtcag ctcccaccct gttggcaaca ggcactctgt cctactcgga cttgcagaac
1201  atggggcacg gcctgatgg ctccccgcaa tttgggtgtc tgtatgagtc aaataactat
1261  gaagagattg ttttctcat gttcacctg aagcaagctt tcccagcagt gtttggtgcc
1321  cagtgaatctt gctgcatgcg gcccaaagtg cttcaaaacc cccccg

```

Abbildung 5: cDNA Sequenz der cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen. Start- und Stoppcodons sind grau unterlegt, die Asp-Box-Sequenzmotive sind gelb unterlegt.

Tabelle 1: Aufreinigungen cytosolischer Sialidase aus unterschiedlichen Geweben.

<i>Herkunft</i>	<i>Ausgangsmaterial</i>	<i>Ausbeute an Sialidase</i>	<i>Literatur</i>
Rattenleber	500g	9 µg	MIYAGI AND TSUIKI, 1985
Rattenmuskel	3 kg	181 µg	MIYAGI et al, 1990
Kulturüberstand von CHO-Zellen	100 l	174 µg	WARNER et al., 1993

Zur weiteren Charakterisierung cytosolischer Sialidasen sind klassische biochemische Verfahren aufgrund der geringen Ausbeuten ungeeignet. Neuere molekularbiologische Verfahren ermöglichen die Produktion ausreichender Mengen beliebiger Proteine. FERRARI et al. gelang 1994 die Klonierung und Expression der aktiven cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen. Zur Expression wurde ein Baculovirus-System eingesetzt und in Sf9 Zellen (aus Raupen des Schmetterlings *Spodoptera frugiperda* etablierte Zelllinie) exprimiert. Das von den Insektenzellen produzierte Enzym ist allerdings im Gegensatz zur nativen Form der Sialidase, die keine Oligosaccharidketten besitzt, teilweise glykosyliert [WARNER et al., 1993].

1.5 Molekularbiologische Methoden

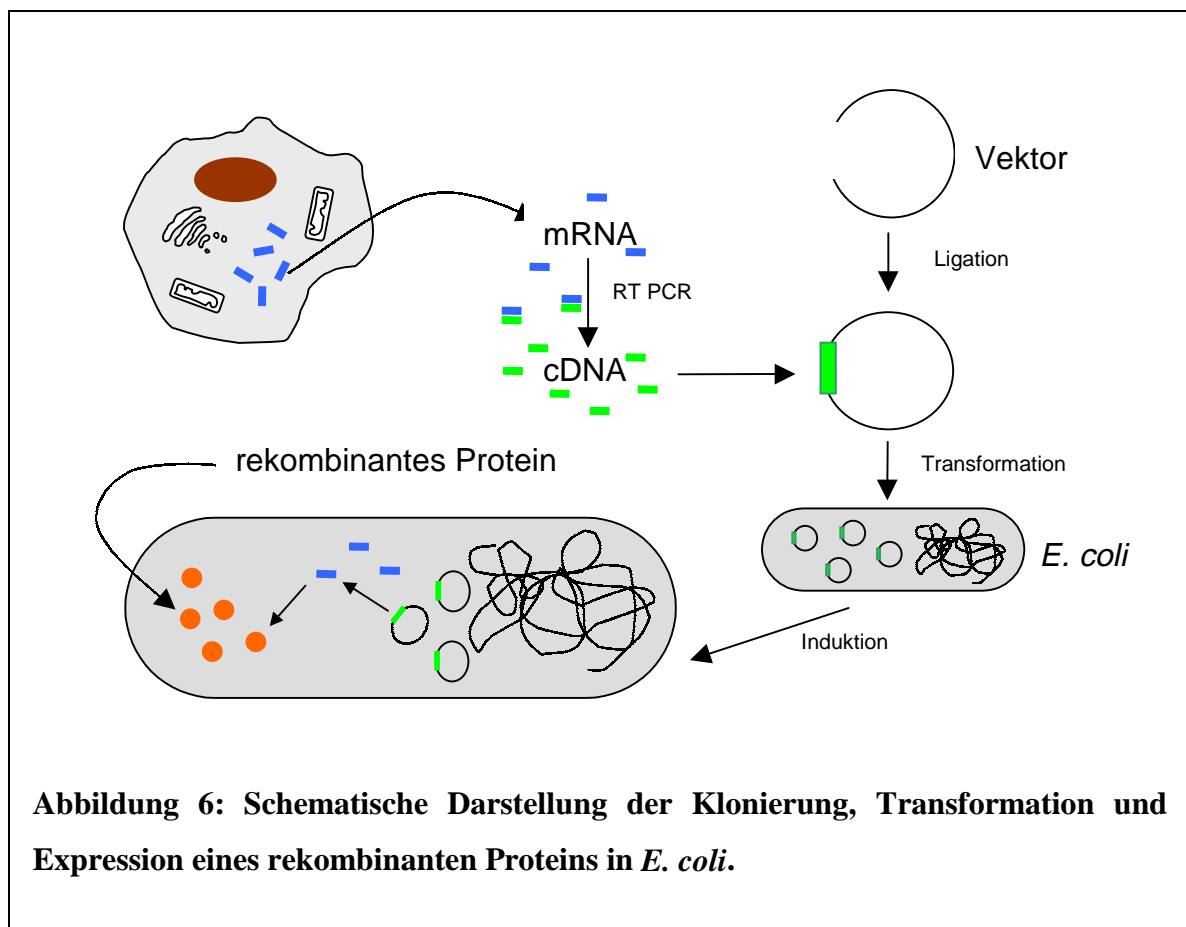
Primäres Ziel einer Genklonierung für biotechnologische Zwecke ist die Expression des klonierten Gens in einem ausgewählten Wirtsorganismus. Leider bietet das Einfügen eines Gens in einen Klonierungsvektor nicht unbedingt eine Gewähr dafür, daß das Gen auch erfolgreich exprimiert wird. Die meisten klonierten Gene haben charakteristische molekulare Eigenschaften. Daher ist ein erheblicher Zeit- und Arbeitsaufwand erforderlich, um festzustellen, unter welchen Bedingungen eine annehmbare Expressionshöhe gewährleistet ist [GLICK AND PASTERNAK, 1995a].

Der am häufigsten verwendete Organismus zur Expression von Proteinen ist *E. coli*. Dieses gramnegative Bakterium ist ohne Zweifel der am besten untersuchte natürlich vorkommende Organismus. *E. coli* Zellen können mit Hilfe bestimmter Vektoren genetisch manipuliert werden und stellen keine besonderen Ansprüche an das Wachstumsmedium. *E. coli* eignet sich besonders für einzelsträngige, nicht glykosylierte Proteine, wie die cytosolische Sialidase aus CHO-Zellen. Für die Produktion humaner

rekombinanter Glykoproteine für den medizinischen Einsatz ist *E. coli* weniger geeignet, da Prokaryonten posttranslationale Modifikationen nur in sehr begrenztem Umfang durchführen.

1.5.1 Klonierung und Transformation von *E. coli*

Eine Möglichkeit zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Zunächst wird die gesamte RNA des Spenderorganismus isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in DNA umgeschrieben. Das Zielgen wird dann mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und in einen Expressionsvektor kloniert. Nach der Transformation der *E. coli* Zelle mit dem Expressionsvektor, der die gewünschte Sequenz enthält, kann die Expression des rekombinanten Proteins induziert werden.



Zur Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien muß zuerst ein geeigneter Vektor ausgewählt werden. Ein Expressionsvektor sollte folgende Bestandteile beinhalten [TUAN, 1997]:

- Ein **selektierbarer Marker**, um das Vorhandensein des Vektors in der Zelle sicherzustellen.
- Ein **regulierbarer transkriptionaler Promotor**, wie *lac*, *trp* oder *tag*, der bei Induktion große Mengen an mRNA Transkripten der klonierten DNA Sequenz herstellt.
- Passende **translationale Kontrollsequenzen** für die ribosomale Bindestelle und den Translationsstart.
- Eine **multiple cloning site (mcs)**, um die Insertion des Fremdgens zu ermöglichen.

Expressionsvektoren mit verschiedenen Eigenschaften und Modifikationen sind kommerziell erhältlich.

1.5.2 Expression von Fusionsprodukten in *E. coli*

Die rekombinante DNA-Technologie ermöglicht die Zusammensetzung verschiedener Gene oder Genteile. Diese Fusionsprodukte haben im Vergleich zu den einzelnen Genen eine Reihe von Vorteilen [TUAN, 1997]:

- Ein Genprodukt kann durch Fusion mit einem geeigneten Partner an ein bestimmtes Zellkompartiment gebunden werden.
- Das Fusionsprodukt wird stabiler exprimiert als das native Protein.
- Die Löslichkeit eines Genprodukts kann verbessert werden.
- Die Aufreinigung eines Genprodukts wird durch den Fusionspartner erleichtert.
- Durch Fusionierung lassen sich multifunktionale Proteine herstellen.

Ein weiterer Grund für den Einsatz von Fusionsprodukten ist der mögliche Abbau von rekombinanten Proteinen in der *E. coli* Wirtszelle. Das Anheften eines stabilen Wirtproteins an das Zielprotein kann zu einem verminderten Abbau des resultierenden Fusionsproteins durch zelleigene Proteasen von *E. coli* führen. Einige Studien haben gezeigt, daß Produkte klonierter Gene als Bestandteile von Fusionsproteinen gegen Degradation durch proteolytische Enzyme der Wirtszelle resistenter sind als separate

rekombinante Proteine. Bei der Klonierung von Fusionsprodukten muß auf die Erhaltung des richtigen Leserasters geachtet werden, da sonst das vom Zielgen codierte Protein nicht hergestellt wird [GLICK AND PASTERNAK, 1995b].

Inzwischen bieten verschiedene Hersteller Expressionssysteme für Fusionsproteine an, die sowohl Expressionsvektoren mit der Sequenz der jeweiligen Fusionspartner als auch Affinitätsmaterialien zur Proteinaufreinigung enthalten. In Tabelle 2 sind einige kommerziell erhältliche Expressionssysteme aufgeführt.

Tabelle 2: Kommerziell erhältliche Expressionssysteme für Fusionsproteine.

<i>Fusionspartner</i>	<i>Expressionssystem</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Affinitätsmatrix</i>
MBP ^a	IMPACT CN System	New England Biolab	Chitin Beads
CBP ^b	pDUAL Expression System	Stratagene	Calmodulin Resin
Thioredoxin	ThioFusion Expression system	Invitrogen	Phenylarsineoxid (PAO)-Agarose
GST ^c	GST Expression System	Amersham Pharmacia Biotech	Glutathione- Sephadex 4B
Polyhistidin	QIAexpress System	Qiagen	Ni-NTA ^d -Agarose

^aMBP, Maltose binding protein; ^bCBP, Calmodulin binding protein; ^cGST, Glutathion S-Transferase;

^dNTA, Nitrilotriacetic acid

1.6 Arbeitsziele

Die zunehmende Bedeutung rekombinanter Glykoproteine aus CHO-Zellen in der Humantherapie fordert die weitere Erforschung der Prozessierung glykosylierter Strukturen im Produktionsprozess. Bei der Produktion mit CHO-Zellen unterliegen rekombinante Glykoproteine nicht nur einer posttranslationalen Modifikation, die für die Synthese korrekter N-Glykosylierungen unverzichtbar ist, sondern auch einer postsekretorischen Modifikation durch Glykosidasen, die durch Zellyse freigesetzt werden. Postsekretorische Modifikationen führen zu einer Veränderung der Glykosylierungsmuster rekombinanter Proteine, wie z.B. der Abspaltung der endständigen Sialinsäuren. Durch die Bindung desialylierter Glykoproteine an den Galaktose-Rezeptor der Leber und die nachfolgende Internalisierung ist die Halbwertszeit dieser Proteine im Blutkreislauf verkürzt. Dadurch wird die Effektivität der produzierten Therapeutika verringert.

Bei der Glykosidase, die für die Desialylierung sekretierter Glykoproteine verantwortlich ist, handelt es sich um die cytosolische Sialidase aus CHO-Zellen. Die Aktivität und Substratspezifität dieses Enzyms bestimmen den Anteil an desialyliertem Produkt und den Desialylierungsgrad der einzelnen Proteine. Vorangegangene Studien haben gezeigt, daß die cytosolische Sialidase auf biochemischem Wege nur in sehr geringen Mengen isoliert werden kann. Die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie ermöglicht die Produktion rekombinanter Proteine, wie der Sialidase auf molekularbiologischem Weg. Mit Hilfe von Klonierungsmethoden kann die für die Sialidase kodierende cDNA in *E. coli* Zellen eingebracht werden. Durch den Einsatz eines geeigneten Expressionssystems ist die Produktion und Aufreinigung größerer Mengen an Sialidase möglich, die für die Charakterisierung des Enzyms eingesetzt werden können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung und der molekularen Charakterisierung der cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen. Ziel dieser Arbeit war es, ein geeignetes Expressionssystem für die cytosolische Sialidase aus CHO-Zellen zu etablieren. Das Enzym sollte als rekombinantes und aktives Fusionsprotein in *E. coli*

exprimiert werden. Daran anschließend mußte eine Aufreinigungsstrategie zur Isolierung des aktiven Fusionsprodukts entwickelt werden. Die Charakterisierung des Produkts und die Herstellung polyklonaler Antikörper sollten die Arbeit abschließen.

Zur Produktion der cytosolischen Sialidase als Fusionsprodukt mußte ein Expressionssystem entwickelt werden, das die Expression eines aktiven Enzyms in ausreichender Menge sicherstellt.

Die Entwicklung einer RT PCR Methode ist zur Herstellung ausreichender Mengen der Sialidase kodierenden cDNA für die Klonierung notwendig. Dazu muß die Zielsequenz in Form von RNA aus dem Spenderorganismus isoliert und durch reverse Transkriptase (RT) in die entsprechende cDNA umgesetzt werden. Die Amplifikation der cDNA erfolgt mittels PCR. Die amplifizierte Zielsequenz kann dann stabil in einen ausgewählten Expressionsvektor kloniert werden. Durch den Einsatz von Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) wird die Expression des Fusionsproduktes in transformierten *E. coli* Zellen induziert. Die Optimierung verschiedener Expressionsparameter sollte zur Produktion eines stabilen Fusionsproteins führen. Restriktionsanalysen ermöglichen die Charakterisierung der Fusionsprodukte auf molekularer Ebene.

Voraussetzung für die Untersuchung der erfolgreichen Expression ist die Etablierung eines enzymatischen Testsystems, mit dem die Aktivität des Fusionsprodukts nachgewiesen werden kann. Der Einsatz von Gelelektrophoresen und von Immunoblotting-Techniken ermöglicht eine Überprüfung des Molekulargewichts des produzierten Fusionsproteins und dient der Identifizierung des Proteins durch den Nachweis der antigenen Determinanten des Fusionspartners.

Ziel der Aufreinigungsstrategie sollte ein hochreines Produkt sein, das für die weitere Charakterisierung in ausreichender Menge zur Verfügung steht und bei Bedarf erneut hergestellt werden kann. Die Substratspezifität des isolierten Enzyms kann mit geeigneten Substraten, wie z.B. Gangliosiden charakterisiert werden. Die Aktivität der gereinigten Fusionsprodukte sollte anhand der Wirkung von Sialidase-Inhibitoren getestet werden. Abschließend sollte das Fusionsprodukt zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung von CHO-Zellen

2.1.1 Zelllinien

Als Donorzellen für Sialidase codierende mRNA wurden drei verschiedene CHO-Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und zur Isolierung der RNA eingesetzt.

Tabelle 3: CHO-Zelllinien zur RNA-Isolierung.

<i>Name</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Ursprung</i>
CHO K1	ATCC, Rockville,MD,USA CCL-61	Prolin defizienter Subklon aus einer CHO-Zelllinie [KAO AND PUCK, 1968]
CHO (AT III) SS3 A2	Behringwerke AG, Marburg	Transfektion von Maus DHFR cDNA und menschlicher AT III cDNA in eine DHFR ⁻ CHO DUKXB1-Zelllinie (ATCC, CRL-9010) [ZETTLMEISSEL et al., 1987]
CHO HC II Klon 6	Prof. Dr. H. Ragg, Universität Bielefeld	Transfektion einer DHFR ⁻ CHO DUKXB1-Zelllinie mit pWT BI2

2.1.2 Kultivierung der CHO-Zellen zur RNA-Isolierung

Kultivierung der Zelllinie CHO SS3 A2:

Die Zelllinie CHO SS3 A2 war bereits an serumfreie Bedingungen adaptiert [RIESE, 1994] und lag als Suspensionszelllinie vor. Die Zellen wurden serumfrei in Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) bei 37°C in mit Wasserdampf gesättigter Luft und 5 % CO₂-Gehalt in Begasungsbrutschränken (Salvis Biocenter 2001, Tecnomara, Fernwald) ungerührt kultiviert. Als Medium wurde eine serumfreie 1:1 Mischung von

DMEM (Life Technologies, Eggenstein) und Ham's F12 (Life Technologies) verwendet [DULBECCO AND FREEMAN, 1959; HAM, 1965; BARNES AND SATO, 1980]. Dem Medium wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Supplemente zugesetzt [MUNZERT, 1996]. Neben Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), das zur Einstellung eines pH-Werts von 7,2 zugegeben wird, benötigen diese serumfrei kultivierten Zellen Humantransferrin (Behringwerke), Rinderinsulin (Sigma, Deisenhofen) und ExCyte I (Bayer Diagnostics München) als Protein- und Lipidzusätze sowie eine Reihe von Aminosäuren (Serva) an Stelle von fötalem Kälberserum (FCS).

Tabelle 4: Supplemente für serumfreies Medium zur Kultivierung von CHO SS2 A3 Zellen.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
NaHCO_3	29 mM	Isoleucin	600 μM
Ethanolamin	125 μM	Alanin	50 μM
Glukose	31 mM	Phenylalanin	200 μM
Humantransferrin	10 mg/l	Histidin	350 μM
Rinderinsulin	10 mg/l	Lysin	300 μM
ExCyte I	1 ml/l	Methionin	150 μM
Asparagin	150 μM	Prolin	450 μM
Aspartat	50 μM	Serin	450 μM
Cystein	250 μM	Threonin	950 μM
Cystin	130 μM	Tryptophan	70 μM
Glutamin	4000 μM	Tyrosin	300 μM
Glutamat	50 μM	Valin	700 μM
Leucin	700 μM	Arginin	700 μM

Die Zellen wurden in der zweiten Passage geerntet. Dazu wurden zweimal je 20 ml Zellsuspension mit jeweils $1,27 \times 10^7$ Zellen 5 min bei 100 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment zur RNA-Isolierung eingesetzt.

Kultivierung der Zelllinie CHO K1:

CHO K1 Zellen sind adhärent wachsende Zellen, die in Kulturflaschen bei 37°C in mit Wasserdampf gesättigter Luft und 5 % CO_2 -Gehalt kultiviert wurden. Als Basalmedium

wurde ebenfalls eine 1:1 Mischung von DMEM und F12 verwendet. Zur Einstellung von pH 7,2 wurden dem Medium 29 mM NaHCO₃ zugesetzt. Da diese Zellen nicht an serumfreie Bedingungen adaptiert waren, wurde mit 10 % FCS im Medium kultiviert.

Konfluent gewachsene Zellen wurden aus 80 cm² Kulturflaschen gewonnen. Dazu wurde zunächst der Kulturüberstand entfernt und die Zellen mit je 10 ml PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte nach der Zugabe von je 2 ml einer 0,25 % igen Trypsin-EDTA-Lösung (Boehringer Mannheim) durch Inkubation für 10 min bei 37°C [NERGER, 1990]. Das Trypsin wurde durch Zugabe von je 20 ml serumhaltigem Medium inaktiviert. Die Zellsuspensionen aus den Kulturflasche mit jeweils ca. 2×10^7 Zellen wurden 5 min bei 100 g abzentrifugiert, die Überstände verworfen und die Sedimente zur RNA-Isolierung eingesetzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung von PBS.

PBS (pH 7,2)	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM KH ₂ PO ₄

Kultivierung von CHO HC II Klon 6 Zellen:

CHO HC II Klon 6 Zellen wurden von Prof. Dr. H. Ragg (Universität Bielefeld, Technische Fakultät, AG Zelluläre Genetik) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden bei 37°C in mit Wasserdampf gesättigter Luft und 7,5 % CO₂-Gehalt in einer Kulturschale kultiviert. Als Medium wurde alpha-MEM (Life Technologies) eingesetzt. Die Supplemente des eingesetzten Mediums sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden wie für CHO K1 Zellen beschrieben mit Trypsin-Lösung abgelöst und die vereinzelt Zellen abzentrifugiert. Das resultierende Zellsediment enthielt ca. 6×10^6 Zellen.

Tabelle 6: Supplemente für alpha MEM zur Kultivierung von CHO HCII Klon 6.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
NaHCO ₃	26 mM
FCS	10 %
Prolin	300 µM
Penicillin Na-Salz	6,3 mg/l
Streptomycin	10 mg/l

2.2 RNA-Isolierung aus CHO-Zellen

Um RNA zu isolieren, ist RNase-freies Arbeiten zwingend erforderlich. Grundsätzlich sind externe und interne Kontaminationsquellen zu unterscheiden. Der Eintrag von externen RNasen kann durch die Verwendung von RNase-freien Lösungen und UV-bestrahlten oder mit 3 % H₂O₂-Lösung behandelten Arbeitsutensilien weitgehend vermieden werden. Die Inaktivierung von RNasen in Lösungen erreicht man durch die Verwendung von Diethylpyrocarbonat (DEPC). Die benötigten Puffer oder Lösungen werden mit 0,1 % DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und anschließend 20 min autoklaviert. Beim Autoklavieren zersetzt sich das karzinogene DEPC in CO₂ und Ethanol. Lösungen, die Aminogruppen enthalten, wie z.B. Tris(hydroxymethyl)aminomethan- (Tris) Puffer, werden mit autoklaviertem DEPC-behandeltem Reinstwasser angesetzt, da DEPC mit Aminogruppen reagiert.

Interne RNasen werden bei der Zellyse freigesetzt. Diese RNasen lassen sich durch Zusatz von Guanidiniumthiocyanat (GuSCN) oder β-Mercaptoethanol zum Lysepuffer inaktivieren.

2.2.1 Gesamt-RNA Gewinnung nach CHOMCZYNSKI AND SACCHI

Die RNA aus den CHO-Zellen konnte nach der Methode von CHOMCZYNSKI AND SACCHI (1987) isoliert werden. Dazu wurde das Zellsediment mit 2 ml Denaturierungslösung (siehe Tabelle 7) gemischt und über Nacht bei –20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Suspension in Glasröhrchen überführt und 200 µl 2 M Natriumacetat-Lösung pH 4,0 zugesetzt und geschüttelt. Dann erfolgte die Zugabe von

2 ml wassergesättigtem Phenol und 400 µl Chloroform / Isoamylalkohol (49:1), und die Probe wurde nochmals geschüttelt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proben zur Phasentrennung 20 min bei 12000 g und 4°C in einer Sorvall Superspeed RC2B Zentrifuge mit einem SS-34 Rotor (Kendro Laboratory Products, Hanau) zentrifugiert. Während sich Lipide in der unteren organischen Phase und Proteine und DNA-Moleküle in der Interphase sammeln, enthält die obere wässrige Phase die RNA. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt. Zur RNA-Fällung wurde das Gemisch über Nacht bei –20°C inkubiert. Das nach 15 min Zentrifugation bei 12000 g und 4°C gewonnene RNA-Sediment wurde in 300 µl Denaturierungslösung aufgenommen, zur zweiten Fällung mit 300 µl Isopropanol gemischt und erneut über Nacht bei –20°C inkubiert und zentrifugiert. Das gewonnene RNA-Sediment wurde zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen, 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl Reinstwasser aufgenommen und bei 60°C 10 min gelöst. Zur photometrischen Messung (siehe 2.2.3) wurden 5 µl entnommen und 1:100 mit Reinstwasser verdünnt. Das RNA-Isolat wurde mit dem dreifachen Volumen 100 % igem Ethanol versetzt und bei –70°C gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Denaturierungslösung.

Denaturierungslösung nach Chomczynski	4 M GuSCN
	25 mM Natriumcitrat
	0,5 % Natriumlaurylsarkosinat
	0,1 M β-Mercaptoethanol (frisch)

2.2.2 Gesamt-RNA Gewinnung mit dem RNeasy Total RNA Kit

Das Zellsediment wurde mit 0,5 ml RTL-Puffer (RNeasy Total RNA Kit, Qiagen, Hilden) resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Zur Scherung der DNA wurde die Suspension 15 mal mit einer 2 ml Spritze durch eine Kanüle mit 0,9 mm Durchmesser gezogen oder mit einem QIAshredder (Qiagen) homogenisiert und bei –70°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der Zelldebris durch 3 min Zentrifugation in einer 5415 C Zentrifuge (Eppendorf GmbH, Hamburg) bei 13000 g abgetrennt. Der Überstand wurde mit 0,5 ml 70 % igem Ethanol gemischt. Die ausgefällte DNA wurde

durch Zentrifugation entfernt. 0,5 ml des Überstands wurden auf eine RNeasy Säule gegeben und 15 sec bei 8000 g zentrifugiert, wobei die RNA an die Säulenmatrix gebunden wird. Der Durchlauf wurde verworfen, dann die restliche Lösung auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Nach Umsetzen der Säule in ein anderes Eppendorfgefäß wurde mit 0,7 ml RW1-Waschpuffer (Kit) gespült und wie oben zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen. Dann folgte zweimaliges Waschen der Säule mit je 0,5 ml RPE-Waschpuffer (Kit). Durch 2 min Zentrifugation bei 13000 g wurde die restliche Flüssigkeit aus der Säule entfernt. Je nach Menge an eingesetztem Zellmaterial wurde jeweils 30 oder 50 µl Reinstwasser zugesetzt. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte durch Wiederholung der Zentrifugation. Die Reinigung wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.4) überprüft. Die gereinigte RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.2.3 Photometrische Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Gesamt-RNA erfolgte photometrisch. Die Absorption bei 260 nm stellt ein direktes Maß für die Menge der gelösten Nukleinsäuren dar. So entspricht $E_{260} = 1$ bei einer Schichtdicke von 1 cm 40 µg / ml RNA. Die gemessenen Extinktionswerte sollten zwischen 0,1-1,0 liegen, da das Lambert-Beersche Gesetz nur für den linearen Bereich gilt. Aus diesem Grund wurden die zu messenden Proben in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Zusätzlich wurden die Extinktionen bei 280 und 320 nm vermessen, um die Reinheit der Isolate zu kontrollieren. Der Quotient E_{260}/E_{280} gibt Aufschluß über die Kontamination mit Proteinen. Für RNA-Analysen sollte der Wert zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Salzzrückstände wurden durch positive Extinktionswerte bei 320 nm angezeigt.

2.2.4 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde nach PELLE AND MURPHY (1993) und nach GODA AND MINTON (1995) mit geringen Modifikationen durchgeführt.

Im nativen Zustand bilden RNA-Moleküle durch Basenpaarung Sekundärstrukturen aus, die das Laufverhalten im Gel beeinflussen. Durch Hitzebehandlung und den Einsatz von denaturierenden Agenzien werden die Wasserstoffbrücken gelöst und die RNA denaturiert.

Tabelle 8: Lösungen für die denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese.

<i>Puffer und Stammlösungen</i>	<i>Substanzen</i>
TAE-Puffer	0,4 M Tris-Acetat, pH 8,0 1 mM EDTA
10 x RNA-Beladungs- / Stopppuffer	0,4 M Tris-Acetat pH 8,0 50 % Glycerin 0,4 % Bromphenolblau (BPB) 1 mM EDTA 2,0 % SDS
GuSCN-Stammlösung	1 M GuSCN in Reinstwasser
EtBr-Stammlösung	10 mg EtBr / ml Reinstwasser

Jeweils 5 µl RNA-Isolat wurden mit 0,5 µl 10 x RNA-Beladungspuffer 3-5 min bei 95°C in einem Heizblock für Eppendorfgefäße inkubiert und dann schnell auf Eis abgekühlt, um die Neubildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Gelkammer und Kamm wurden 30 min mit 3 % iger H₂O₂-Lösung behandelt. Zum Lösen der Agarose wurde TAE-Puffer mit 1,3 % iger Agarose aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde frische GuSCN-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 20 mM zugesetzt und 10 µl EtBr-Stammlösung pro 100 ml Gel zugegeben. Danach wurde das Agarosegel in eine 7,3 x 10,3 x 0,2 cm Minigelkammer gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Verfestigen wurde das Gel mit TAE-Puffer und 20 mM GuSCN überschichtet und der Kamm entfernt. Pro Bahn wurden je 5 µl der RNA-Probe eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 130 V für 30-60 min. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) zum Gel kann die Auftrennung während der Elektrophorese mit Hilfe eines Transilluminators (312 nm Anregungswellenlänge, Biometra, Göttingen) überprüft werden. EtBr ist ein interkalierender, fluoreszierender Farbstoff, der bei Anregung mit einer Wellenlänge von 300 nm (UV-Bereich) eine Emission bei 590 nm (Rotlicht-Bereich) zeigt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit einer Sofortbildkamera (Polaroid direct screen instant DS 34) zur Dokumentation fotografiert.

2.3 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Technik zur Vervielfältigung (Amplifikation) eines DNA-Segments, das zwischen zwei bekannten Regionen einer Sequenz liegt. Als Vorlage wird im Falle der RT PCR isolierte Gesamt-RNA eingesetzt, wobei durch Umschreiben der mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) einzelsträngige (ss) cDNA synthetisiert wird. Dabei werden Oligo (dT)-Primer eingesetzt, die nur an die PolyA Sequenzen der mRNA binden und als Erkennungsstellen für die RT dienen. Zur Amplifikation des gewünschten DNA-Segments werden spezifische Primerpaare eingesetzt, die an die flankierenden Regionen der Sequenz binden und als Startpunkte der cDNA-Replikation fungieren.

Das Grundprinzip der PCR gliedert sich in drei Schritte, die zyklisch wiederholt werden. Zunächst wird die Vorlage-DNA in Anwesenheit der Primer, den vier dNTPs und der Polymerase bei 95°C denaturiert. Dann erfolgt eine Abkühlung auf die Annealingtemperatur, bei der die Primer spezifisch an die DNA binden. Zuletzt erfolgt die Verlängerung der Primer (Elongation) durch DNA-Polymerase bei einer für das Enzym optimalen Temperatur. Da die Produkte jeder Amplifikationsrunde als Vorlage für die nächste dienen, verdoppelt sich theoretisch mit jedem Zyklus die Menge der gewünschten Ziel-DNA.

Als Vorlage ist eine Menge von 10 pg ausreichend. Bei einer DNA mit ca. 2 kb erhält man nach 30-35 Zyklen 0,5 bis 1 µg Produkt. Um eine erneute Polymerasezugabe nach jedem Denaturierungsschritt zu vermeiden, werden thermostabile Polymerasen, wie z.B. Taq DNA Polymerase (isoliert aus *Thermus aquaticus*) eingesetzt. Zur Durchführung der Reversen Transkription und der nachfolgenden PCR mit AmpliTaq Polymerase wurde der Gene Amp RNA PCR Kit (N808-0017, Perkin Elmer) verwendet. Für die Durchführung der PCR mit anderen Polymerasen (siehe Tabelle 9) wurden die unter 2.3.2 genannten Puffer und Lösungen in den von den jeweiligen Herstellern empfohlenen Konzentrationen eingesetzt.

2.3.1 Reverse Transkription

In Ethanol gelagerte RNA-Isolate (siehe 2.2) wurden in 25 µl Portionen abgedampft und in 10-20 µl Reinstwasser aufgenommen. In Reinstwasser gelagerte Proben wurden direkt nach dem Auftauen eingesetzt. Alle RNA-Isolate wurden zuerst bei 72°C 15 min denaturiert und dann sofort auf Eis abgekühlt.

RT-Mix pro 10 µl Ansatz (Lösungen sind im Kit enthalten):

▪ 25 mM MgCl ₂	2,0 µl
▪ 10 x PCR Buffer II	1,0 µl
▪ 10 mM dNTPs	4,0 µl
▪ RNase Inhibitor	0,5 µl
▪ Oligo d(T) Primer	0,5 µl
▪ MuLV (muriner Leukämievirus) RT (50 U / µl)	0,5 µl
▪ RNA-Isolat oder Reinstwasser (negativ Kontrolle)	1,5 µl

Die RT-Reaktion wurde im DNA Thermocycler 480 (Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Bei der Benutzung von Thermocyclern ohne beheizbaren Deckel sollte die Probe mit Mineralöl überschichtet werden, um die Aufkonzentrierung der Ansätze durch Kondensation von Wasser am Reaktionsgefäßdeckel zu vermeiden.

Zunächst wurden die Proben bei 25°C für 10 min vorinkubiert, dann die Reaktion durch Erwärmen der Proben auf 42°C gestartet und für 15 min fortgesetzt. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 95°C gestoppt. Die anschließende 10 minütige Inkubation bei 95°C führt zu einer vollständigen Denaturierung der RT und zur Überführung der doppelsträngigen Nukleinsäuren in Einzelstränge. Bis zur Durchführung der PCR wurden die Proben im Thermocycler auf 5°C gekühlt.

2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 9: Liste der verwendeten DNA Polymerasen.

<i>Polymerase</i>	<i>Hersteller</i>
AmpliTaq DNA Polymerase (5 U / μ l) (Taq Polymerase)	GeneAmp RNA PCR Kit, Perkin Elmer, Weiterstadt
KlenTherm (KlenTaq) DNA Polymerase (10 U / μ l) (Taq Polymerase)	GeneCraft, Münster
AccuTherm DNA Polymerase (5 U / μ l) (Pfu Polymerase)	GeneCraft, Münster
Synergy DNA Polymerase (10 U / μ l) (Mischung aus Taq und Pfu Polymerase)	GeneCraft, Münster

Der limitierende Faktor der PCR ist die Genauigkeit der Polymerase. Taq DNA Polymerasen bauen pro Zyklus ca. 2×10^{-4} falsche Nucleotide ein. Bei einer Zyklenzahl von 30 Runden beträgt die absolute Fehlerfrequenz damit 0,25 % [SAIKI et al., 1988b], d.h. eine von 400 bp wird fehlerhaft eingebaut. Pfu DNA Polymerasen (isoliert aus *Pyrococcus furiosus*) und Taq / Pfu DNA Polymerase-Mischungen zeigen eine weitaus größere Genauigkeit [CLINE et al., 1996, BARNES, 1994]. Auch modifizierte Taq DNA Polymerasen mit einer N-terminalen Deletion zeigen eine verminderte Fehlerfrequenz [BARNES, 1992]. DNA Polymerasen und Mischungen, die für die PCR eingesetzt wurden, sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Auf der Basis der bekannten Sequenz für die cytosolische Sialidase aus CHO-Zellen [FERRARI et al., 1994] wurden folgende Primer ausgewählt:

Plus-Strang-Primer: (5' → 3')

CHOSIAL 01

GTCCTGCAGAA**GGATCC**GCTATTCC

*Bam*HI

CHOSIAL 41

TCAGT**AGATCT**

*Bg*III

GTCCTGCAGAAAGGAGACGCTATTCC

CHOSIAL 51

TCAGT**GGATCC**

*Bam*HI

GTCCTGCAGAAAGGAGACGCTATTCC

Minus-Strang-Primer: (5' → 3')

CHOSIAL 12

GCATGCAGCAA GATCACTGGGCACC

CHOSIAL 42

TCGAT**AGATCT**

*Bg*III

GGCACCAAACACTGCTGGGAAA

CHOSIAL 52

TCAGT**GAATTC**

*Eco*RI

GCATGCAGCAAGATCACTGGGCACC

Die Synthese wurde in Auftrag gegeben (Life Technologies, Eggenstein), und je nach Primer wurden zwischen 30 und 70 nmol Nucleinsäuren geliefert. Die Primer wurden mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt.

PCR-Mix für AmpliTaq Polymerase:

- | | |
|--------------------------------|----------|
| ▪ 25 mM MgCl ₂ | 2,0 µl |
| ▪ 10 x PCR Puffer II | 4,0 µl |
| ▪ Plus-Strang-Primer (100 µM) | 0,5 µl |
| ▪ Minus-Strang-Primer (100 µM) | 0,5 µl |
| ▪ Polymerase | 0,25 µl |
| ▪ Reinstwasser | ad 40 µl |
- + 10 µl Ansatz aus der Reversen Transkription

Da die AmpliTaq Polymerase Bestandteil des Gene Amp RNA PCR Kits ist, sind die Komponenten für die RT-Reaktion und die PCR aufeinander abgestimmt. Daher unterscheidet sich der PCR-Mix in folgenden Punkten von den üblicherweise verwendeten Zusammensetzungen. Der Zusatz von dNTPs ist nicht notwendig, da in der RT-Reaktion ausreichend dNTPs für die nachfolgende PCR zugesetzt wurden. Bei der RT-Reaktion beträgt die Endkonzentration an MgCl₂ 5 mM, bei der PCR aber nur 2 mM, deshalb ist im PCR Puffer II kein MgCl₂ enthalten (siehe 2.3.1). Es werden nur 4 µl Puffer pro 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt, weil der 10 µl RT-Ansatz bereits die richtige Pufferkonzentration enthält.

Im Gegensatz zum PCR-Mix für die AmpliTaq Polymerase können die im PCR-Mix für die folgenden Polymerasen enthaltenen Komponenten und Konzentrationen universell für jede beliebige Probe, die die Zielsequenz enthält, eingesetzt werden.

PCR-Mix für KlenTherm-, AccuTherm- und Synergy Polymerase:

- | | |
|--|----------|
| ▪ Polymerase Puffer (mit MgCl ₂) (10x) | 5,0 µl |
| ▪ 10 mM dNTPs | 8,0 µl |
| ▪ Plus-Strang Primer (100 µM) | 0,5 µl |
| ▪ Minus-Strang Primer (100 µM) | 0,5 µl |
| ▪ Polymerase | 0,5 µl |
| ▪ Reinstwasser | ad 40 µl |
- + 10 µl Ansatz aus der Reversen Transkription

Die PCR wurde mit folgendem Programm im Thermocycler durchgeführt:

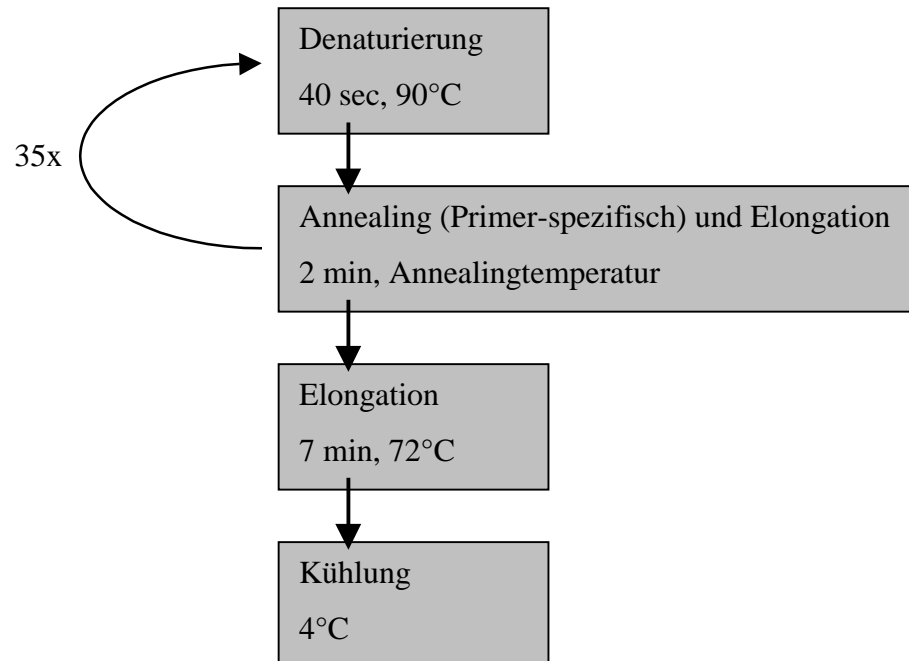


Abbildung 7: Darstellung des PCR-Programms mit Denaturierung, Annealing und Elongation.

Bei der PCR wurden je nach Primerpaar unterschiedliche Annealingtemperaturen eingesetzt, die eine spezifische Anlagerung der Primer ermöglichen. Die Bildung unspezifischer PCR-Produkte wird dadurch deutlich verringert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.3) aufgetrennt und zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.3.3 DNA-Agarosegelelektrophorese

Tabelle 10: Puffer und 1kb Leiter DNA-Referenz für die DNA-Agarosegelelektrophorese.

<i>Puffer und Referenz</i>	<i>Substanzen</i>
TAE-Laufpuffer	0,4 M Tris-Acetat pH 8,0 1 mM EDTA
10 x DNA Beladungspuffer	4 M Tris-Acetat pH 8,0 50 % Glycerin 0,1 M EDTA 1 % SDS 0,1 % BPB
Referenz	1 kb Leiter Marker X (Boehringer, Mannheim) 25-100 ng / µl Ladepuffer

Die DNA Agarosegelelektrophorese wurde mit 1-2 % igen Agarosegelen durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Laufpuffer durch Aufkochen gelöst, in die Gelkammer gegossen und der Kamm zur Formung der Probestaschen eingesetzt. Das verfestigte Gel wurde mit TAE-Laufpuffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die RT PCR-Produkte, Plasmidisolate und Restriktionsprodukte wurden 10:1 mit 10 x DNA-Beladungspuffer gemischt. Ein Volumen von 10 bis 15 µl pro Probe wurde in die Geltaschen gegeben. Von der Referenz wurden 10 µl (0,25-1 µg) eingesetzt. Der Lauf wurde bei 100-130 V 30-60 min durchgeführt. Die Gele wurden im Ethidiumbromid-Bad (10 µg EtBr / ml Reinstwasser) 5-15 min inkubiert, 5 min mit Reinstwasser gewaschen und dann mit Hilfe des Transilluminators und der Sofortbildkamera (siehe 2.2.4) dokumentiert.

2.4 Subklonierung mit dem Original TA Cloning Kit

Zur Subklonierung der RT PCR-Produkte wurde der Original TA Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Holland) eingesetzt. Das Insert wurde mit dem pCR 2.1 Vektor ligiert.

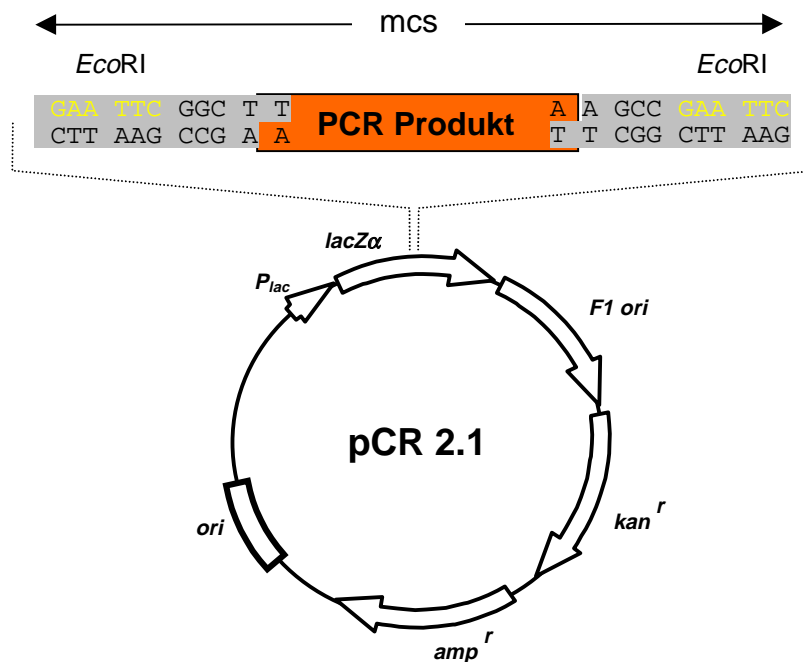


Abbildung 8: Schematische Übersicht des pCR 2.1 Vektors mit der Insertionsstelle.

Taq DNA Polymerasen katalysieren die Addition einzelner Desoxyadenosine am 3'-Ende aller DNA Doppelstränge, die bei der PCR gebildet werden. Durch die entstandenen Adenosin-Überhänge können beliebige PCR-Produkte ohne weitere Aufreinigungsschritte in den pCR 2.1 Vektor, der mit 3'-Thymidin-Überhängen ausgestattet ist, kloniert werden. Zusätzlich verfügt der Vektor über eine mcs (multiple cloning site), die die Insertionsstelle flankiert. Eine mcs enthält verschiedene Restriktionsschnittstellen, die das Einfügen oder Heraustrennen von Fragmenten ermöglicht.

Durch die Ampicillin- und Kanamycinresistenz (*amp^r*, *kan^r*) und durch Insertion des PCR Produkts in das *lacZ α* -Gen des Vektors, dessen Expression mit einem *lac*-Promotor (*P_{lac}*) gesteuert wird, lassen sich erfolgreich transformierte Subklone identifizieren (Abbildung 8). Das *lacZ α* -Gen codiert für β -Galaktosidase, ein hydrolytisches Enzym, das Laktose in Glukose und Galaktose spaltet. Wird Laktose als einziger Energielieferant angeboten, kann das Disaccharid nur in Anwesenheit von β -Galaktosidase von der Bakterienzelle genutzt werden. Die Zellen ohne Insert, bei denen das *lacZ α* -Gen nicht unterbrochen ist, setzen Laktose in organische Säuren um. Die Senkung des pH-Werts durch die Säureproduktion kann auf Indikator-Agarplatten, die Laktose enthalten, nachgewiesen werden (siehe 2.4.2). Der ColE1-origin (*ori*), der zur Replikation in *E. coli* dient, sorgt für eine hohe Kopienanzahl des Vektors in der Zelle, während der F1-origin (*F1 ori*) die Produktion von (ss) DNA bewirkt und so die Sequenzierung vereinfacht.

Der Vektor mit dem Insert läßt sich zusammen mit den Zellen unbegrenzt vermehren, so daß jederzeit eine ausreichende Menge an Insert für weitere Versuche zur Verfügung steht. Zusätzlich ist das Insert in dieser Form vor enzymatischen Degradationen durch Exonukleasen geschützt.

2.4.1 Ligation mit dem pCR 2.1 Vektor

Ligationsmix (Kit):

- | | |
|---------------------------------------|-----------|
| ▪ T4 DNA Ligase (2 Weiss U / μ l) | 1 μ l |
| ▪ 10 x Ligationspuffer | 1 μ l |
| ▪ pCR 2.1 (25 ng / μ l) | 2 μ l |
| ▪ Reinstwasser | 4 μ l |

(0,015 Weiss U T4 DNA Ligase ligieren 5 μ g *Hind*III-Fragmente des Bakteriophagen λ in 30 min bei 16°C [SAMBROOK et al., 1989])

Zur Ligation wurden 2 μ l RT PCR Produkt mit dem Ligationsmix gemischt; die Kontrolle wurde mit 2 μ l Reinstwasser durchgeführt. Ligationsansatz und Kontrolle wurden über Nacht bei 14°C im Thermomixer 5436 (Eppendorf) geschüttelt und bis zur Transformation bei –20°C gelagert.

2.4.2 Transformation von *E. coli* Inf α F' mit den Ligationsprodukten

Die kompetenten *E. coli* Inf α F' Zellen (im Kit enthalten) wurden bei 4°C aufgetaut, 2 μ l 0,5 M β -Mercaptoethanol zugesetzt und vorsichtig gemischt. Je 2 μ l Ligationsansatz wurde zu den Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock für 30 sec bei 42°C. Nach Zugabe von je 250 μ l auf 37°C vorgewärmtem SOC Medium (im Kit enthalten) wurden die Zellen 1 h bei 37°C und 150 U/min auf dem Rotationsschüttler (Certomat U, Braun Biotech International, Melsungen) geschüttelt. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 50 μ g / ml Medium zugesetzt und weitere 2 h geschüttelt. Je Ansatz wurden 50 μ l und 200 μ l auf EMB-LB-Agar (siehe Tabelle 11) mit 150 μ g / ml Ampicillin in Petrischalen (90 mm Durchmesser, Diagonal, Münster) ausgestrichen und über Nacht im 37°C Inkubator B 6120 (Heraeus) bebrütet.

Tabelle 11: Medienbestandteile von SOC Medium und EMB-LB-Agar.

<i>Medium</i>	<i>Substanzen</i>
SOC Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glukose 50 mg / ml Ampicillin*
EMB-LB-Agar	Lennox L Agar (Life Technologies) 0,3 mg / ml Eosin 50 μ g / ml Methylenblau 2 mg / ml KH ₂ PO ₄ 150 μ g / ml Ampicillin 25 mM Laktose

- nach 1 h zugesetzt

Da diese *E. coli* Zellen keinen *lac*-Repressor bilden, ist eine Induktion des *lacZ*-Gens nicht erforderlich. Erfolgreich transformierte Zellen bilden weiße bis rosafarbene Kolonien, da das *lacZ*-Gen durch Insertion unterbrochen ist. Eine schwache Rotfärbung der Kolonien ist auf die Verwertung der Glukose aus dem SOC-Medium (siehe Tabelle 11), und die damit verbundene Säureproduktion zurückzuführen. Dagegen bilden untransformierte Zellen rote Kolonien, da die Verstoffwechselung der Laktose zu einer starken Säureproduktion führt, die durch pH-Wert Senkung eine Rotfärbung der Indikatoren im Medium hervorruft.

2.4.3 Überprüfung der Transformation

Die Kontrolle der Transformation erfolgte durch die Isolierung der Plasmide und eine nachfolgende Restriktionsanalyse zum Nachweis der Sialidase cDNA Sequenz.

2.4.3.1 Plasmidisolierung mit Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit

Der Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München) wurde eingesetzt, um die Plasmide aus den Transformanden zu isolieren.

Transformanden, die weiße bis rosafarbene Kolonien bilden, wurden in 3,5 ml LB Medium (Life Technologies), supplementiert mit 100 µg / ml Ampicillin und 25 µg / ml Kanamycin, überimpft und bei 37°C in Kulturröhrchen bei 120 U/min auf dem Rotationsschüttler über Nacht kultiviert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte nach dem BIO RAD QUANTUM PREP PLASMID MINIPREP KIT INSTRUCTION MANUAL. Je 2 ml Aliquots der Kulturen wurden in 2 ml Eppendorfgefäße gegeben und 30 sec bei 13000 g in einer 5415 C Zentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und zuerst 200 µl Cell Resuspension Solution (Kit) und dann 250 µl Cell Lysis Solution (Kit) zugesetzt. Die Zellyse erfolgte unter Mischung durch mehrfaches Umdrehen der Eppendorfgefäße. Nach der Zellyse wurden 250 µl Neutralization Solution (Kit) zugegeben und die Probe durch mehrfaches Umdrehen der Gefäße gemischt. Dabei sollte sich ein Präzipitat bilden. Die Probe wurde für 5 min bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl Matrix Suspension (Kit) zum Überstand gegeben und vorsichtig gemischt. Die Suspension aus Überstand und Matrix Suspension wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit einem Spin Filter (Kit) überführt und für 30 sec zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der SpinFilter wieder in das Eppendorfgefäß

eingesetzt. Zum Waschen der Matrix wurde 500 µl Wash Solution (Kit) zugegeben und für 30 sec zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, wobei 2 min zentrifugiert wurde, um die Flüssigkeit zu entfernen. Der Spin Filter wurde in ein frisches Eppendorfgefäß umgesetzt und die isolierten Plasmide mit 100 µl Reinstwasser durch 30 sec dauerndes Zentrifugieren eluiert. Die isolierten Plasmide wurden bei –20°C gelagert oder sofort zur Restriktionsanalyse (siehe 2.4.3.2) eingesetzt.

2.4.3.2 Restriktionsanalyse

Die Plasmidisolate der Transformanden wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Dabei wurde das Insert je nach eingesetztem Primerpaar mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Bgl* II oder *Hind*III aus dem Vektor geschnitten. Zur Identifizierung der berechneten charakteristischen Fragmente wurde das Insert zusätzlich noch mit *Sca*I oder *Pst*I geschnitten.

Tabelle 12: Endkonzentrationen der SuRE / Cut Buffer A und B in den Restriktionsansätzen bei Einsatz von.

<i>SuRE / Cut Buffer A</i>	<i>SuRE / Cut Buffer B</i>
33 mM Tris-Acetat pH 7,9	10 mM Tris-HCL pH 8,0
10 mM Mg-Acetat	5 mM MgCl ₂
66 mM K-Acetat	100 mM NaCl
0,5 mM DDT	1 mM β-Mercaptoethanol

Tabelle 13: Prozentuale Endonuklease-Aktivität von Restriktionsenzymen in SuRE / Cut Buffer A und B (nach Hersteller).

<i>Restriktionsenzym</i>	<i>SuRE / Cut Buffer A</i>	<i>SuRE / Cut Buffer B</i>
<i>Bam</i> HI	100 %	100 %
<i>Bgl</i> II	100 %	100 %
<i>Hind</i> III	50-75 %	100 %
<i>Pst</i> I	25-50 %	25-50 %
<i>Sca</i> I	1-10 %	100 %

Die Plasmidisolate wurden je nach Restriktionsenzym (siehe Tabelle 13) mit 10 x Puffer A (SuRE / Cut Buffer A, Boehringer, Mannheim) oder mit 10 x Puffer B (SuRE / Cut Buffer B, Boehringer, Mannheim) auf die in Tabelle 12 angegebenen Endkonzentrationen eingestellt. Zur Spaltung wurden jeweils 10 U *EcoRI*, *BamHI*, *Bgl II*, *HindIII*, *PstI* und 2 U *ScaI* pro 10 µl Ansatz eingesetzt. Die Reaktion wurde 30-50 min bei 37°C durchgeführt und die Restriktionsfragmente in 2 % Agarosegelen (siehe 2.3.3) aufgetrennt.

2.5 Klonierung der Sialidase cDNA in Expressionsvektoren

Zur Expression rekombinanter Proteine werden häufig Expressionsvektoren verwendet, die Proteine mit einem Fusionspartner koppeln, der die Identifizierung und die Aufreinigung des Zielproteins erleichtert. Zur Klonierung der Sialidase aus CHO-Zellen wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Das QIAexpress System (Qiagen, Hilden) arbeitet mit einem 6xHis-affinity tag, der für sechs Histidinreste codiert, die N- oder C-terminal an das Zielprotein angehängt werden. Das GST Gene Fusion System (Pharmacia, Freiburg) dagegen bedient sich eines vollständigen Proteins, der Glutathion S-Transferase, die N-terminal an das rekombinante Protein angefügt wird.

2.5.1 Das QIAexpress System

Bei diesem System werden Vektoren verwendet, die für einen 6xHis affinity tag kodieren. Proteine, die mit sechs hintereinander angeordneten Histidinen ausgestattet sind, haben eine besonders hohe Affinität gegenüber Nickel. Die Affinitätsreinigung der rekombinanten Fusionsproteine wird mit Ni-Chelaten durchgeführt, die an eine Trägermatrix gebunden sind. Als besonders wirksam hat sich dabei NTA (Nitrilotriacetic acid) erwiesen. NTA besitzt vier Chelatbindungsstellen, die Metallionen komplexieren können. Das exprimierte Protein kann durch eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose aufgereinigt werden. pQE-Vektoren enthalten einen P_{T5}-Promotor eine Ampicillin- (*bla*) und eine Chloramphenicolresistenz (*cat*) zur Selektion positiver Transformanden. Drei verschiedene pQE-Expressionsvektoren wurden zur Klonierung eingesetzt.

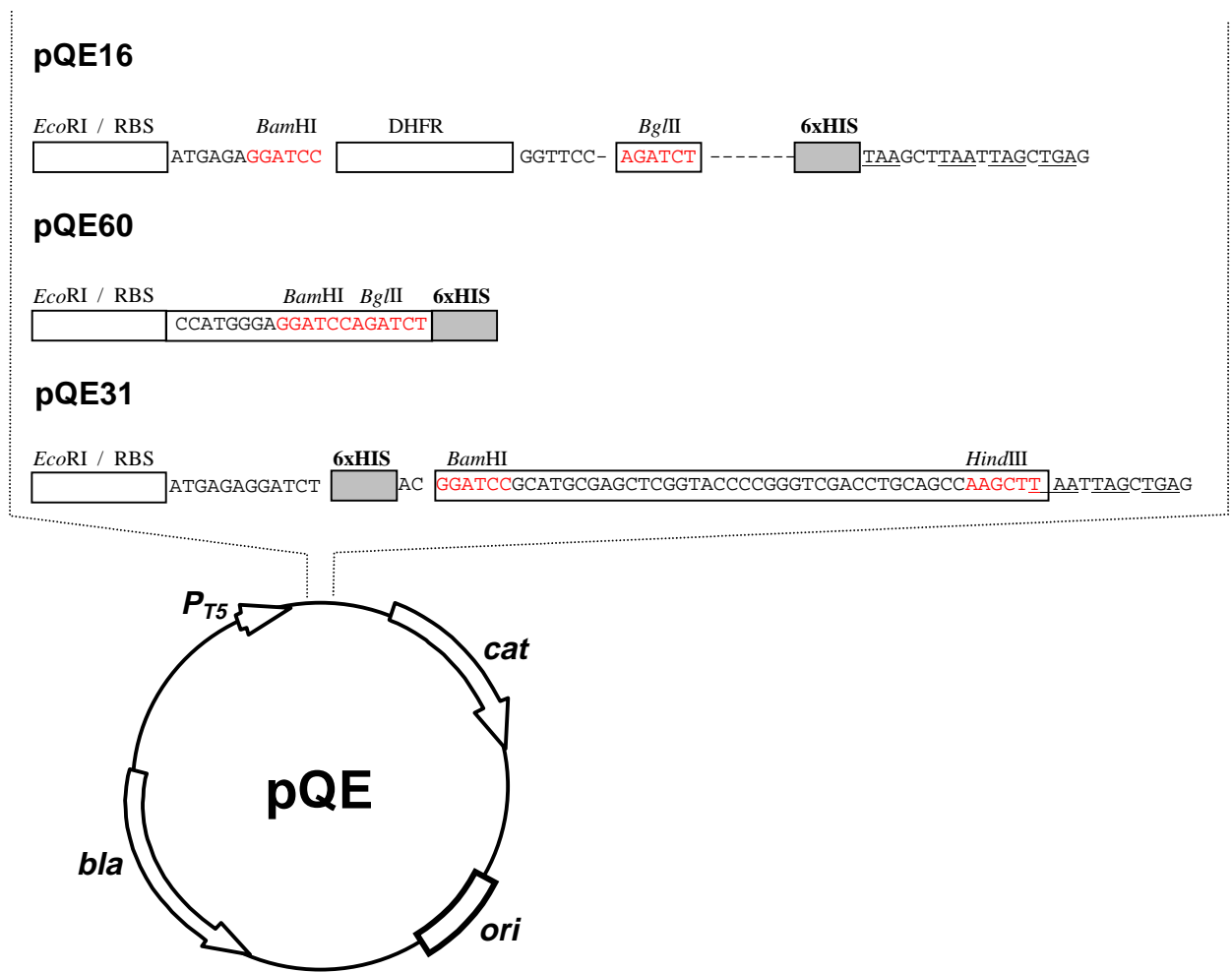


Abbildung 9: Schematische Übersicht der pQE-Expressionsvektoren.

Der Einsatz der Expressionsvektoren pQE60 und pQE16 führt, wenn die *Bam*HI- und die *Bgl*III-Schnittstellen zur Klonierung verwendet werden, zu einem C-terminalen 6xHis-tag. Beim pQE16-Vektor wird dabei die Sequenz für Dihydrofolatreduktase (DHFR) herausgeschnitten. Da sowohl *Bam*HI als auch *Bgl*III zu GATC-Überhängen führen (siehe Abbildung 9), kann ein mit *Bgl*III allein verdautes Insert in die Expressionsvektoren kloniert werden. Ein C-terminaler 6xHis-tag hat den Vorteil, daß bei der Affinitätschromatographie nur vollständig translatierte Proteine aufgereinigt werden.

Der pQE31-Vektor kodiert für einen N-terminalen 6xHis-tag und ermöglicht eine Insertion von *Bam*HI-*Hind*III-Fragmenten.

2.5.2 Das GST Gene Fusion System

Zur Expression wurde der pGEX-2T Vektor (Pharmacia) verwendet (siehe Abbildung 10). Dieser Vektor kodiert für Glutathion S-Transferase (GST). Wird ein Gen in die „multiple cloning site“ (mcs) kloniert, findet eine direkte Kopplung zwischen der GST kodierenden Region und der inserierten cDNA statt. Als resultierendes Genprodukt entsteht ein Fusionsprotein mit der GST am N-terminalen Proteinende. Am C-terminalen Ende der GST ist zusätzlich die Sequenz für eine Thrombinschnittstelle eingebaut, so daß Proteine ohne Thrombinschnittstelle von der GST abgespalten werden können.

Der Vektor besitzt ein Ampicillinresistenzgen (*amp^r*) und einen *tac*-Promotor (P_{tac}) für eine effiziente Expression des Fusionsproteins. Durch das *lacI^q*-Gen wird ein Repressor gebildet, der an den Promotor bindet. Die Transkription des Fusionsproteins kann durch die Bindung von IPTG an den Repressor induziert werden. Zur Replikation besitzt der Vektor einen pBR322 origin (*ori*).

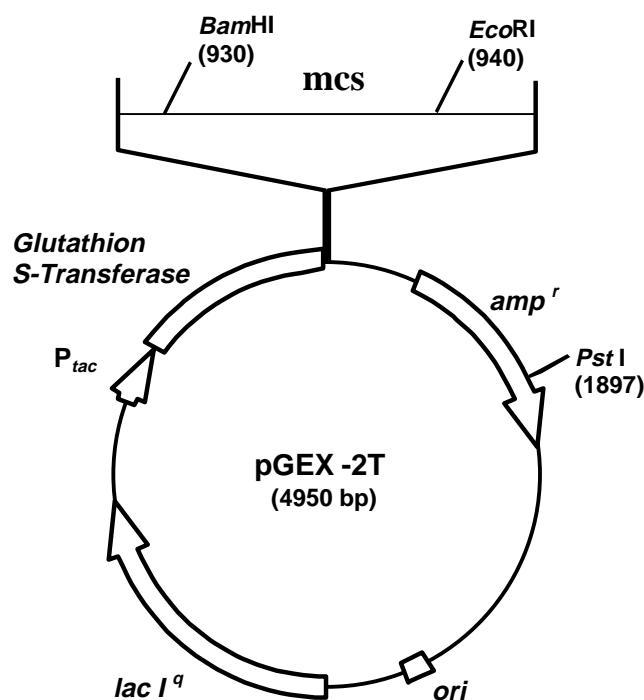


Abbildung 10: Schematische Übersicht des pGEX-2T Expressionsvektors.

2.5.3 Herstellung der Vektoren

Von Herrn Prof. Dr. J. Frey (Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, Lehrstuhl für Biochemie) wurden 0,5 µg pGEX-2T Vektor zur Verfügung gestellt. *E. coli* Inf α F' wurde mit dem pGEX-2T Vektor transformiert und auf Ampicillin selektiert. Die Durchführung der Transformation erfolgte wie unter 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben. Dabei wurden 2 µl pGEX-2T Vektor (1 ng / µl) an Stelle des Ligationsansatzes zugesetzt. 200 µl des Ansatzes wurden auf Petrischalen mit Lennox L Agar, supplementiert mit 100 µg / ml Ampicillin, ausplattiert.

Drei *E. coli* XL1-blue Stämme mit den Vektoren pQE31, pQE16 und pQE60 wurden von Herrn Prof. Dr. H. Jockusch (Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie) zur Verfügung gestellt.

Die Vektoren wurden mittels alkalischer Lyse aus den *E. coli* Zellen isoliert und durch DNA-Fällung mit Ethanol gereinigt und konzentriert. Die gereinigten Isolate wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die linearen Vektoren wurden mit RNase und alkalischer Phosphatase behandelt. Durch die RNase werden RNA Moleküle, die die elektrophoretische Auftrennung beeinflussen, abgebaut. Die Phosphatase spaltet die Phosphatreste der 5'-Vektorenden ab, die von der T4 Ligase (siehe 2.4.1) benötigt werden, um DNA Doppelstränge zu verbinden. Die Religation der Vektoren wird dadurch verhindert. Die linearisierten, dephosphorylierten Expressionsvektoren wurden mit dem QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen) aus der Reaktionslösung extrahiert.

2.5.3.1 Plamidisolierung mittels Alkalische Lyse

Die Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse [MANIATIS et al., 1989a] wurde mit je 80 ml Kulturansätzen mit *E. coli* XL1-blue pQE31, pQE16 und pQE60 und mit 80 ml Kulturansätzen mit *E. coli* Inf α F' pGEX-2T durchgeführt.

Die Lösungen für die alkalische Lyse (AL) sind in Tabelle 14 aufgeführt. Zur Entfernung des Kulturüberstandes wurden 8 x 10 ml Zellsuspension für 10 min mit der Sorvall RC-5C Zentrifuge (Kendro) in einem SS-34 Rotor (Kendro) bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden nach Dekantieren der Überstände mit je 1 ml AL-Puffer resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Suspensionen wurden bei 13000 g in der 5415 C Zentrifuge (Eppendorf) 30 sec zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Zellsedimente wurden in je 200 µl eisgekühlter Lösung 1

aufgenommen und geschüttelt. 400 µl Lösung 2 wurden zugesetzt, fünfmal invertiert und dann 300 µl eisgekühlte Lösung 3 zugesetzt. Die Proben wurden 10 sec kopfüber geschüttelt, für 3 min auf Eis gekühlt und dann 5 min bei 16000 g bei 4°C in der Biofuge 28 RS (Kendro) zentrifugiert. Je 600 µl Überstand wurden mit 600 µl eisgekühltem Phenol / Chloroform (1:1) gemischt und 2 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Je 600 µl der Proben wurden mit 600 µl Isopropanol (-20°C) versetzt und 2 min bei Raumtemperatur gefällt. Dann wurde erneut bei 13000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und die Überstände entfernt. Die Sedimente wurden mit je 1 ml 70 % igem Ethanol gewaschen, 20 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann in je 50 µl 5 mM Tris-HCl pH 8,5 bei 37°C gelöst.

Tabelle 14: Lösungen für die Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse.

<i>Lösungen und Puffer</i>	<i>Substanzen</i>
AL-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 0,1 M Glukose 1 mM EDTA
Lösung 1	25 mM Tris-HCl pH 8,0 50 mM Glukose 10 mM EDTA
Lösung 2 (frisch)	0,2 M NaOH (aus 10 M NaOH) 1 % SDS
Lösung 3	3 M Kaliumacetat 5 M Essigsäure

2.5.3.2 Reinigung und Anreicherung der Plasmide durch DNA-Fällung mit Ethanol

Zur Entfernung der Phenolreste wurden je 180–200 µl der Plasmidisolate mit 20 µl 3 M Na-Acetat pH 6,3 und 440 µl Ethanol (-20°C) gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt. Die Proben wurden mit 13000 g bei 4°C 15 min zentrifugiert, die Überstände entfernt, dann mit je 1 ml 70 % igem Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Sedimente wurden bei Raumtemperatur für 30 min getrocknet und in

je 30 µl 5 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen. Die gereinigten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

2.5.3.3 Restriktion der Plasmide mit Endonukleasen

Zur Ligation mit dem Insert wurden die Plasmide zunächst durch Restriktion mit Endonukleasen geschnitten. Die Plasmidisolate wurden mit 10 x Puffer A oder B (SuRE / Cut Buffer A oder B, Boehringer) (siehe 2.4.3.2) 1:10 im Restriktionsansatz gemischt.

Restriktionsansatz:

▪ Plasmidisolat	16 µl
▪ Puffer A oder B	2 µl
▪ Restriktionsenzym (20 U / µl)	1 µl
▪ Reinstwasser	1 µl

Die Ansätze wurden 50 min bei 37°C inkubiert. Die Restriktionsprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.3) kontrolliert, dann dephosphoryliert und anschließend mit RNase behandelt (siehe 2.5.3.4).

2.5.3.4 Dephosphorylierung und RNase-Behandlung

Für die Dephosphorylierung wurde SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Boehringer, Mannheim) aus arktischen Garnelen (*Pandalus borealis*) verwendet. Zur Einstellung optimaler Reaktionsbedingungen wurde der mit der Phosphatase gelieferte Dephosphorylierungspuffer (0,5 M Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA) eingesetzt. Die RNase (RNase A, Biometra, Göttingen) wurde in Reinstwasser gelöst, dann 10 min zur Entfernung der DNase-Aktivität bei 95°C inkubiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Reaktionsansatz:

▪ Restriktionsansatz	10,5 µl
▪ SAP (3 U / µl)	2,0 µl
▪ RNase A-Stammlösung (1,25 U / µl)	1,0 µl
▪ Dephosphorylierungspuffer	1,5 µl

Der Reaktionsansatz wurde 50 min bei 37°C inkubiert.

2.5.3.5 Aufreinigung der Expressionsvektoren mit dem QIAgen Gel Extraction Kit

Nach den vorangegangenen Behandlungen enthalten die Reaktionsansätze außer den Vektoren noch Restriktionsenzyme, RNase, Phosphatase, Restriktionsfragmente und RNA-Fragmente. Durch Einsatz des QIAgen Gel Extraction Kits konnten die geschnittenen, dephosphorylierten Vektoren aus den Reaktionsansätzen extrahiert werden.

Zur Extraktion wurden die Restriktionsansätze mit Reinstwasser auf jeweils 50 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von Puffer QX 1 (Kit) wurden die Proben bei 50°C für 10 min inkubiert. Das gesamte Volumen je einer Probe wurde auf eine QIAquick Säule gegeben und diese in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Dann wurde die Probe 1 min bei 13000 g in der 5415 C Zentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und 0,75 ml PE-Puffer (Kit) zugesetzt. Die Säule wurde erneut zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und zum Entfernen der Flüssigkeit aus der Probe ein drittes Mal zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß umgesetzt und der entsprechende Vektor mit je 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 eluiert. Das Eluat mit dem jeweiligen Vektor wurde bei –20°C gelagert.

2.5.4 Bereitstellung des Inserts

Als Quelle für das Insert dienten die aus den positiven Subklonen isolierten mit den Sialidase cDNA-Fragmenten ligierten pCR 2.1 Vektoren (siehe 2.4). Die Produktion und Isolierung der Vektoren erfolgte wie unter 2.4.3.1 beschrieben. Die Plasmidisolate wurden mit Endonukleasen geschnitten und die Restriktionsprodukte in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Die Insertbanden wurden aus den Gelen ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (siehe 2.5.3.5) aufgereinigt. Die Aufreinigungen wurde durch Testen eines Aliquots mittels DNA-Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.3) kontrolliert.

2.5.4.1 Restriktion der Plasmidisolierungen der *E. coli* Inf α F'

Subklone

Für den Nachweis des Inserts wurden die Plasmide mit bestimmten Endonukleasen geschnitten. Dabei entstehen Fragmente definierter Größe.

Restriktionsansatz:

▪ Plasmidisolate	80 μ l
▪ Puffer A oder B (Boehringer, Mannheim)	10 μ l
▪ Restriktions-Endonuklease (20 U / μ l)	5 μ l
▪ Reinstwasser	5 μ l

Die Restriktionsansätze wurden 60 min bei 37°C inkubiert.

2.5.4.2 Auftrennung und Isolierung der Sialidase cDNA-Fragmente

Die Restriktionsansätze wurden in 20 μ l Portionen auf fünf Geltaschen eines 2 % igen Agarosegels aufgetragen und die Elektrophorese wie unter 2.3.3 beschrieben durchgeführt. Die Insertbande wurde auf dem Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zu dem Gelstück wurden 600 μ l QX-Puffer (QIAquick Gel Extraction Kit, siehe 2.5.3.5) gegeben und die Probe bei 56°C für 10 min unter mehrmaligem Schütteln gelöst. Die Isolierung des entsprechenden Inserts wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit wie beschrieben durchgeführt und die Isolate in einem 2 % igen Agarosegel getrennt.

2.5.5 Ligation der Sialidase cDNA-Fragmente mit den Expressionsvektoren

Die Ligation der Fragmente mit den Vektoren wurde mit der T4 DNA Ligase und dem Ligationspuffer aus den Original TA Cloning Kit (siehe 2.4.1) durchgeführt.

Ligationsansätze:

a) pQE31 / *Bam*HI-*Hind*III-Fragment

▪ T4 DNA Ligase (4 Weiss U / µl)	1 µl
▪ 10 x Ligationspuffer	1 µl
▪ pQE31 (ca. 5-10 ng / µl)	4 µl
▪ <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment	4 µl
▪ Kontrolle: Reinstwasser ohne Sialidase cDNA-Fragment	4 µl

b) pQE16 / *Bgl* II-*Bgl* II-Fragment

▪ T4 DNA Ligase (10 Weiss U / µl)	2 µl
▪ 10 x Ligationspuffer	2 µl
▪ pQE16 (ca. 10-20 ng / µl)	5 µl
▪ <i>Bgl</i> II- <i>Bgl</i> II-Fragment	15 µl
▪ Kontrolle: Reinstwasser ohne Sialidase cDNA-Fragment	4 µl

c) pQE60 / *Bgl* II-*Bgl* II-Fragment

▪ T4 DNA Ligase (10 Weiss U / µl)	2 µl
▪ 10 x Ligationspuffer	2 µl
▪ pQE60 (ca. 10-20 ng / µl)	5 µl
▪ <i>Bgl</i> II- <i>Bgl</i> II-Fragment	15 µl
▪ Kontrolle: Reinstwasser ohne Sialidase cDNA-Fragment	4 µl

d) pGEX-2T / *Bam*HI-*Eco*RI-Fragment

▪ T4 DNA Ligase (4 Weiss U / µl)	2 µl
▪ 10 x Ligationspuffer	3 µl
▪ pGEX-2T (ca. 10-20 ng / µl)	5 µl
▪ <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI-Fragment	20 µl
▪ Kontrolle: Reinstwasser ohne Sialidase cDNA-Fragment	4 µl

Die Proben wurden über Nacht bei 14°C im Thermomixer 5436 geschüttelt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.5.6 CaCl_2 Transformation von *E. coli* M15 pREP4 Zellen

Die Transformationsfähigkeit von *E. coli* Zellen ist abhängig vom eingesetzten *E. coli* Stamm und von der verwendeten Transformationsmethode. Im Gegensatz zu einigen anderen Mikroorganismen besitzen *E. coli* Zellen von Natur aus nur eine geringe Kompetenz zur Aufnahme von Plasmid-DNA. COHEN et al. (1972) konnten zeigen, daß CaCl_2 -behandelte *E. coli* Zellen wesentlich effektiver Plasmid-DNA aufnehmen. Diese Methode wurde soweit verfeinert [HANAHAN, 1983], daß Ausbeuten von 10^7 bis 10^8 Transformanten pro μg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden können.

2.5.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Lösungen, die bei der Herstellung kompetenter Zellen benötigt werden, sind in Tabelle 15 aufgelistet. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 10 ml TYM broth, supplementiert mit $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ Kanamycin, mit *E. coli* M15 pREP4 beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Certomat U bei 40 U/min geschüttelt. Je 5 ml der Kultur dienten als Inokulum für 500 ml TYM broth ohne Supplementierung. Bei 37°C und 120 U/min wurden die Zellen bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,5-0,6 angezogen. Die Zellsuspension wurde in zwei sterile, vorgekühlte Zentrifugenbecher gefüllt und bei 2800 g für 10 min bei 4°C mit der Sorvall RC-5C Zentrifuge im Sorvall GS-3 Rotor abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellsedimente unter Rühren mit einem Glasstab in je 20 ml vorgekühlter TFB I-Lösung resuspendiert. Die Suspensionen wurden erneut für 5 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Sedimente wurden in je 10 ml vorgekühlter TFB II-Lösung resuspendiert und vereinigt. Die kompetenten Zellen wurden in $500 \mu\text{l}$ -Portionen in vorgekühlte Reaktionsgefäße gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Transformation wurden die Zellen bei -70°C gelagert.

Tabelle 15: Medium und CaCl₂-Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen.

<i>Medium und Lösungen</i>	<i>Substanzen</i>
TYM broth	2 % Bacto Trypton 0,5 % Bacto Yeast Extract 0,1 M NaCl 0,1 M MgCl ₂
TFB I	30 mM K-Acetat 50 mM MnCl ₂ 0,1 M KCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerol
TFB II	10 mM Na-MOPS pH 7,0 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerol

2.5.6.2 Transformation von *E. coli* M15 pREP4 Zellen mit den Ligationsprodukten

Zur Transformation wurden zunächst 500 µl kompetente *E. coli* M15 pREP4 bei 4°C aufgetaut. Je 100 µl kompetente Zellen wurden mit je 10 µl Ligationsansatz (siehe 2.5.5) gemischt und die Ansätze für 30 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Proben bei 37°C hitzebehandelt und nach 5 min je 900 µl 37°C warmes LB Medium, supplementiert mit 100 µg / ml Ampicillin und 25 µg / ml Kanamycin, zugegeben. Die Proben wurden bei 130 U/min für 1 h bei 37°C auf dem Certomat U geschüttelt und dann auf Lennox L Agar, supplementiert mit 100 µg / ml Ampicillin und 25 µg / ml Kanamycin, ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Zur Identifikation der einzelnen Klone wurden Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf frische Petrischalen mit Antibiotika supplementiertem Lennox L Agar übertragen und numeriert.

2.5.7 Nachweis und Isolierung der transformierten Klone

Die Kontrolle der Transformation erfolgte durch den Nachweis der Insertsequenz in den Transformanden. Dazu wurden bis zu 50 Transformanden für die Kolonie-PCR eingesetzt. Positive Klone wurden kultiviert, die Plasmide isoliert und eine Restriktionsanalyse zur Bestätigung der Resultate durchgeführt.

2.5.7.1 Kolonie-PCR

Transformanden wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der entsprechenden Plattenkultur übertragen und am Boden eines frischen Reaktionsgefäßes zerrieben. Zu den zerriebenen Zellen wurden je 10 µl KlenTherm Polymerase PCR-Mix (siehe 2.3.2) gegeben und die Reaktionsgefäße im Thermocycler plaziert. Das unter Punkt 2.3.2 beschriebene PCR-Programm wurde verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels DNA-Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.3) aufgetrennt und auf das Vorhandensein der Insertsequenz hin untersucht.

2.5.7.2 Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse

Die Plasmide der ausgewählten Transformanden wurden, wie unter 2.4.3.1 beschrieben, isoliert und zum Nachweis des Inserts einer Restriktionsanalyse unterzogen (siehe 2.4.3.2).

2.6 Kultivierung der Klone, IPTG-Induktion und Herstellung bakterieller Lysate

2.6.1 Induktion der Transformanden mit IPTG

Transformanden, die das Sialidase cDNA-Insert enthalten, wurden mit IPTG induziert. Dabei bindet IPTG an das *lacI^q*-Genprodukt und schwächt dessen Bindung an den Promotor, so daß die Transkription erfolgen kann. Die intensive Expression von Proteinen in *E. coli* kann zu Fehlfaltungen oder zur Bildung unlöslicher Aggregate, die auch als Einschlußkörper (inclusion bodies) bezeichnet werden, führen. Da die Rückfaltung des Proteins in den aktiven Zustand oft sehr schwierig oder gar nicht möglich ist, sollte die Expression nach Möglichkeit auf die Produktion des Proteins in

löslicher und aktiver Form ausgerichtet sein. Entscheidend für die Menge an exprimiertem Protein sind die Induktionstemperatur, die Induktionsdauer, die IPTG-Konzentration und die Wachstumsphase der Bakterien zum Zeitpunkt der Induktion.

Die transformierten *E. coli* Zellen wurden bei Kulturdichten mit einer OD₆₀₀ von 0,4-1,2 mit IPTG-Konzentrationen zwischen 0,05 und 2 mM induziert. Die Induktionsdauer betrug 1-6 h bei Induktionstemperaturen von 37°C und 25°C.

2.6.2 Kultivierung der *E. coli* M15 pREP4 Klone

Zur qualitativen Expressionsanalyse wurden die Bakterien in kleinem Maßstab, d.h. von 1-10 ml Kulturvolumen (small-scale) kultiviert. Für die quantitativen Analysen waren größere Kulturvolumina zwischen 250 und 1000 ml notwendig.

2.6.2.1 Small-scale Kultivierung (1-10 ml Kulturvolumen)

Die transformierten *E. coli* Klone wurden bei 37°C in LB Medium, supplementiert mit 100 µg / ml Ampicillin und 25 µg / ml Kanamycin, über Nacht auf dem Rotationsschüttler (Certomat U) bei 120 U/min angezogen. 0,5 ml der Übernachtskultur wurde mit 3 ml supplementiertem LB Medium gemischt, die Kultivierung für 60 min fortgesetzt und dann für 1-6 h mit IPTG induziert. Nach der Induktion wurden 1,5 ml der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß gegeben und bei 13000 g in der 5415 C Zentrifuge für 30 sec abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente bei -20°C eingefroren.

2.6.2.2 Kultivierung im Schüttelkolben (250-1000 ml Kulturvolumen)

Für die Kultivierung im Schüttelkolben (Kolben mit Schikanen, Braun Biotech International, Melsungen) wurde, wie oben beschrieben, eine Übernachtskultur angesetzt. Die Vorkultur wurde 1:10 mit Antibiotika supplementiertem LB Medium verdünnt. Die Kolbenkulturen wurden bei 37°C und 220 U/min (Certomat U) bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4-1,2 angezogen. Dann wurden die Zellen mit IPTG induziert. Nach der Induktion wurde das Medium durch Zentrifugation in der Sorvall RC-5C Zentrifuge mit einem Sorvall GS-3 Rotor (Kendro) bei 8000 g und 4°C (10 min)

abgetrennt. Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente bei -20°C eingefroren.

2.6.2.3 Kultivierungen im Bioreaktor (25 Liter Kulturvolumen)

Die Kultivierung im 25 L Maßstab wurde von Herrn Dipl.-Ing. T. Schäffer am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. E. Flaschel (Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Lehrstuhl für Fermentationstechnik) durchgeführt.



Abbildung 11: MBR 30 Liter Rührkesselbioreaktor mit Begasungsregleinheit.

Für die Durchführung der Fermentation wurde ein LB Mediumkonzentrat für 25 Liter benötigt. Dazu wurden 500 g LB Medium in 5 Liter Reinstwasser gelöst. Das Konzentrat wurde im Fermenter auf 25 Liter aufgefüllt und für 25 min bei 121°C hitzesterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde über Septen im Bioreaktordeckel sterilfiltriertes Ampicillin- (2,5 g Ampicillin in 20 ml Reinstwasser) und Kanamycin-Konzentrat (625 mg Kanamycin in 20 ml Reinstwasser) zugegeben. Die Kultivierung wurde durch Animpfung des Reaktors mit einem Inokulum von 250 ml Kolbenkultur in der stationären Phase über ein Septum gestartet. Durch Zugabe von Säure (10 % H_3PO_4) oder Lauge (2 N NaOH) über Zulaufpumpen wurde der pH-Wert während der Kultivierung bei 7,0 gehalten. Um eine Sauerstofflimitierung zu verhindern, wurde die Luftsättigung des Mediums während des Satzbetriebs durch Erhöhung bzw. Verringerung der Rührerdrehzahl konstant auf 80 % gehalten. Der Luftzustrom betrug dabei 10 l / min bei einem Reaktorinnendruck von 0,2 bar. Die Probenentnahme zur Bestimmung der optischen Dichte erfolgte manuell mit Hilfe eines dampfsterilisierbaren in den Reaktorboden eingebauten Ventils.

Die Zellen wurden zunächst bis zu einer OD_{600} von 1,5-2,3 bei 37°C kultiviert. Dann wurde der Reaktor auf 25°C abgekühlt. Die Induktion wurde durch Zugabe von sterilfiltrierter IPTG-Lösung in Endkonzentrationen von 0,1-1 mM IPTG gestartet. Nach einer Induktionsdauer von 3 h 10 min für die erste Fermentation und 2 h 35 min für die zweite Fermentation wurde der Reaktorinhalt über das Probenentnahmeventil abgelassen und durch Querstromfiltration (Pall-Filtron) mit sieben Centrasetten 5 / 10 mit 1 MDa Ausschlußgrenze (Sigma) auf ca. 1 Liter aufkonzentriert und dabei gegen PBS (siehe Tabelle 5) oder 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0 mit 0,1 M NaCl dialysiert. Um eine proteolytische Degradation des Fusionsproteins zu verhindern, wurden den Puffern Proteaseinhibitoren zugesetzt. Zur Hemmung der Zinkproteasen wurde jeweils Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bis zu einer Endkonzentration von 10 mM und zur Hemmung von Serinproteasen Polymethylsulfonylfluorid (PMSF) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Aus dem Konzentrat wurde durch Zellaufschluß und Abtrennung der festen Zellbestandteile das bakterielle Lysat hergestellt.

2.6.3 Herstellung bakterieller Lysate

Nach der Induktion müssen die Zellen aufgeschlossen werden, um das produzierte Protein freizusetzen. Dazu wurden, je nach Kulturvolumen, verschiedene Zellaufschlußmethoden eingesetzt.

2.6.3.1 Zellaufschluß von small-scale Kultivierungen

Die Sedimente wurden für den Zellaufschluß bei 4°C aufgetaut und in 980 µl PBS mit 1 % Triton X 100 resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Stammlösung (Lysozyme from chicken egg white, 50 kU / mg Protein, (Sigma, Deisenhoven) 50 mg / ml in Reinstwasser) wurden die Zellen 30 min bei 4°C aufgeschlossen. Um die, durch die Freisetzung der DNA-Moleküle hervorgerufene, hohe Viskosität der Probe zu verringern, wurde die Lösung 15 mal mit einer Spritze durch eine Kanüle mit 0,9 mm Durchmesser gezogen. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 13000 g für 20 min entfernt und der Überstand bei -20°C eingefroren.

2.6.3.2 Zellaufschluß von Schüttelkolbenkulturen

Zur Lyse der Zellen wurden die Sedimente bei 4°C schonend aufgetaut und in je 12,5 ml PBS mit 10 mM EDTA und 1 mM PMSF resuspendiert. Die Suspensionen wurden in ein Rosettengefäß (Rosett Cooling Cell, Branson, Carouge-Geneve, Schweiz) überführt, auf Eis gekühlt und mit dem Sonifier 250 (Branson, Carouge-Geneve, Output control set: Position „5“) je viermal in 10 sec Intervallen mit einer 5 mm Mikrotipspitze konstant beschallt. Die Suspensionen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) gegeben und 20 % Triton X 100 Lösung in PBS bis zu einer Endkonzentration von 1 % Triton X 100 zugesetzt. Nach 40 min Rotation bei kleinster Stufe auf dem REAX2 (Heidolph, Kelheim) ist die Zellyse abgeschlossen. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation der Suspensionen mit der RC-5C Zentrifuge im SS-34 Rotor für 10 min bei 12000 g und 4°C abgetrennt und die resultierenden bakteriellen Lysate bei -20°C eingefroren.

2.6.3.3 Zellaufschluß des Fermentationskonzentrats

Der Zellaufschluß von 1 Liter Bakterienkonzentrat erfolgte in einem Düsenhomogenisator (Mini-Lab Type 8.30H, Rannie Inc., St. Paul, USA) bei 800 bar in zwei Durchläufen. Die Zelltrümmer wurden aus dem Rohlysat durch 20 min

Zentrifugation (RC-5C Zentrifuge) in einem GS-3 Rotor (Kendro) bei 12000 g und 4°C entfernt. Das resultierende bakterielle Lysat wurde bis zur Aufreinigung, jedoch nicht länger als 24 h, bei 4°C gelagert.

2.7 Expressionsanalytik

2.7.1 Expressionsanalyse mit Gesamtproteinextrakten

In transformierten Klonen werden rekombinante Proteine, im Gegensatz zu zelleigenen Proteinen, im Überschuß produziert. Daher läßt sich die Expression anhand von Gesamtproteinextrakten feststellen. Die Auftrennung der Extrakte mittels SDS-PAGE gibt Aufschluß darüber, ob und in welcher Weise das rekombinante Protein von den Klonen exprimiert wird und ob die Proteingröße im Bereich des theoretisch zu erwartenden Molekulargewichts liegt.

2.7.1.1 Herstellung der Extrakte

Von induzierten Kulturen wurde je 1 ml Probe entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Als Kontrolle wurde eine nicht-induzierte Kultur mitgeführt. Die Proben wurden bei 13000 g für 30 sec zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und mit 100 µl SDS-PAGE Puffer (siehe Tabelle 16) gemischt. Dann wurden die Proben für 30 min bei 37°C im Thermomixer geschüttelt.

2.7.2 SDS-PAGE

Tabelle 16: Zusammensetzung des SDS-PAGE Puffers.

SDS-PAGE Puffer	3 % β -Mercaptoethanol
	3 % SDS
	0,3 % Bromphenolblau (BPB)
	10 % Glycerin

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde das PhastSystem (Pharmacia) eingesetzt. Als Referenz wurden LMW Kalibrierungs Kit Proteine (Pharmacia) eingesetzt. Eine Portion

Markerproteine (575 µg Proteine) wurde in 100 µl SDS-PAGE Puffer gelöst. Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proben und die Markerproteine mit SDS-PAGE Puffer verdünnt und im Heizblock 7 min bei 95°C inkubiert, 10 min bei 13000 g abzentrifugiert und je 50 µl des Überstands in Reaktionsgefäße überführt. Die Markerproteine wurden zusammen mit den Überständen auf einen PhastGel Sample Applikator 8 / 1 (8 x 1 µl) aufgegeben und dann automatisch auf ein 8-25 % PhastGel Gradientengel mit aufliegenden Pufferstreifen (PhastGel SDS buffer strips) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde, wie vom Hersteller im PHASTSYSTEM APPLICATION FILE NO. 370 angegeben, durchgeführt.

Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Blue. Die Gele wurden 5 min bei 50°C mit Coomassie Blue Färbelösung (eine Tablette PastGel Blue R 350 (Pharmacia) in 300 ml Reinstwasser mit 16 % Essigsäure und 33 % Isopropanol) entwickelt und anschließend für 30 min bei 50°C mit Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 20 % Isopropanol in Reinstwasser) entfärbt.

Bei geringen Proteinkonzentrationen, die nach der Coomassie-Färbung nur schwache Banden ergaben, wurden die Gele mit der sensitiveren Silberfärbung im PhastSystem nach HEUKESHOVEN AND DERNICK (1985) angefärbt.

2.7.3 Nachweis der rekombinanten cytosolischen Sialidase

Ein Enzymaktivitätstest gibt Aufschluß darüber, ob das produzierte Fusionsprotein einen funktionsfähigen Sialidaseanteil besitzt. Dabei wird 4-Methylumbelliferyl- α -D-N-Acetylneuraminsäure (MUF-Neu5Ac, Sigma, Deisenhofen) als synthetisches Substrat eingesetzt. Sialidasen spalten MUF-Neu5Ac in das fluoreszierende Cumarinderivat Methylumbelliferon (MUF) und die Neuraminsäure [GRAMER AND GOOCHIE, 1993a]. Nach Anregung im UV-Bereich (362 nm) zeigt MUF ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 448 nm. Die Emission wird mit einem Fluoreszenzdetektor (spectrofluorometric detector RF-551, Shimadzu, Kyoto) quantifiziert.

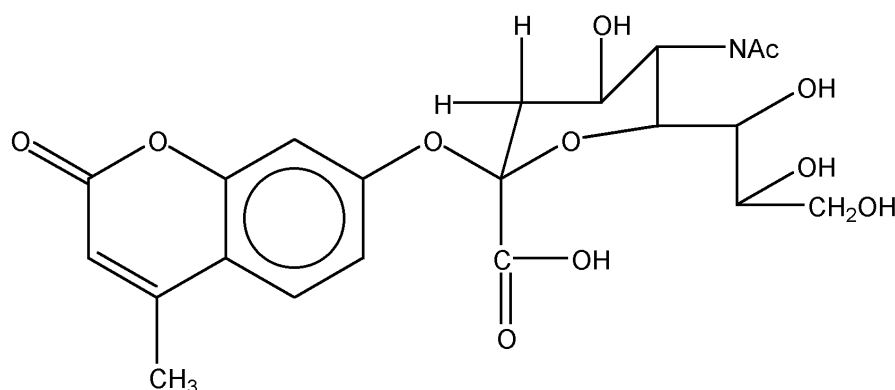


Abbildung 12: MUF-Neu5Ac, MG = 467,4

2.7.3.1 Nachweis der Sialidaseaktivität

Um die Autohydrolyse von MUF-Neu5Ac zu berücksichtigen, wurde bei jedem Test eine Kontrolle ohne Enzym mitgeführt. Die Reaktionsansätze wurden 1 h bei 37°C im Thermomixer 2436 auf kleinster Stufe geschüttelt und die Reaktion mit je 900 µl 0,2 M Glycin / NaOH pH 10,4 gestoppt. Die Ansätze wurden 15 min bei 16000 g in der Biofuge Pico (Kendro) zentrifugiert und 500 µl der Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden 1:100 mit Reinstwasser verdünnt und in 1 ml Quarz-Küvetten gefüllt. Nach der Platzierung der Küvetten im Fluoreszenzdetektor wurden die Proben gemischt und die Fluoreszenz nach 10 sec gemessen.

Reaktionsansatz:

- | | |
|--|-------|
| ▪ Sialidase-haltige Lösung (1:10 verdünnt) | 65 µl |
| ▪ 1 M Natriumacetatpuffer pH 5,5 | 10 µl |
| ▪ 4 mM MUF-Neu5Ac in Reinstwasser | 25 µl |

Die Berechnung der Sialidase-Aktivität erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die durch lineare Regression erstellt wurde. Der Proportionalitätsfaktor beträgt 2,3437. Die Sensitivität der Methode liegt im Picomol-Bereich. Unter Berücksichtigung aller

Verdünnungsschritte und der Autohydrolyse lassen sich Umsetzungen ab $50 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit hinreichender Genauigkeit messen und berechnen.

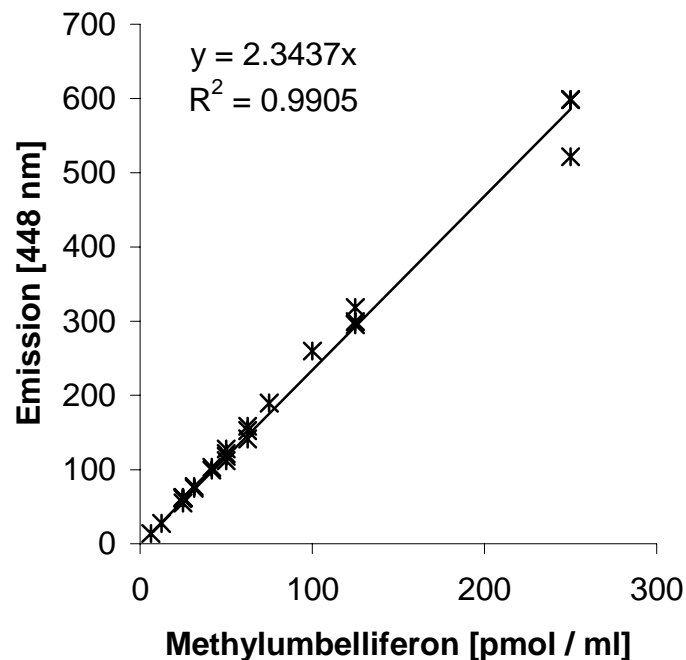


Abbildung 13: Eichgerade basierend auf Fluoreszenzmessungen eingewogener Mengen an Methylumbelliferon.

2.7.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva) an Proteine und Polypeptide mit einem Molekulargewicht über 10 kDa wurde zur quantitativen Proteinbestimmung der Proben genutzt [BRADFORD, 1976]. Bei der Bildung der Farbstoff-Protein-Komplexe verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 450 nm nach 595 nm. Die Extinktionsdifferenz zwischen den beiden Wellenlängen ist dabei proportional zur Proteinkonzentration. Zur Proteinbestimmung wurden jeweils 500 μl Bradford-Reagenz (1,9 % Perchlorsäure, 0,06 % Coomassie Brilliant Blue G 250, filtriert) zu 500 μl Sialidase-haltige Lösung gegeben und die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 450 nm gemessen. Die Extinktionsdifferenz wurde berechnet

und der Proteingehalt der Probe mit Hilfe einer mit BSA erstellten Eichgeraden ermittelt.

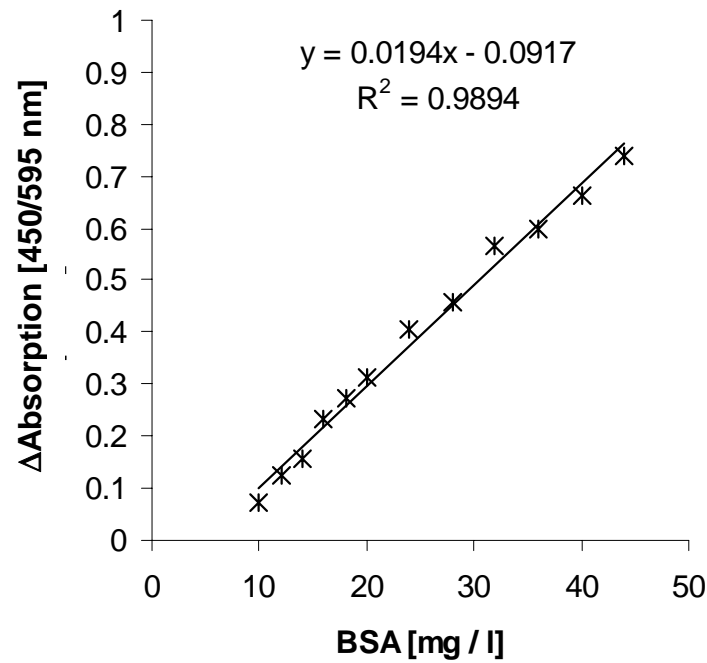


Abbildung 14: Eichgerade basierend auf Absorptionsmessungen eingewogener Mengen an BSA.

2.7.5 Immunoblot

Das Prinzip des Immunoblots beruht auf der spezifischen Bindung zwischen Antikörpern und ihren Antigenen. Dabei werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine zunächst auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und so immobilisiert. Die unspezifischen Proteinbindungsstellen der beladenen Membran werden abgesättigt und dann spezifische Antikörper an das Zielprotein gebunden. Die spezifischen Antikörper sind nicht konjugiert und werden durch eine Farbreaktion des zweiten mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpers detektiert.

Tabelle 17: Lösungen für die Immunoblots.

Lösungen und Puffer	Substanzen
PBS	140 mM NaCl, pH 7,3 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Absättigungslösung	PBS 3 % BSA (Albumin bovine Fraction V, pH 7,0, standard grade, lyophilisiert, Serva, Heidelberg)
1. AK-Lösung	gegen das Zielprotein gerichteter Antikörper in Absättiger
Waschpuffer	PBS 0,5 % BSA 0,3 % Tween 20 (Serva, Heidelberg)
2. AK-Lösung	gegen den 1. Antikörper gerichteter mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper in Absättiger
Substratpuffer	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Substratlösung	200 µl NBT (Nitro Blue Tetrazolium) / BCIP (5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat) Stammlösung (Boehringer, Mannheim) in 10 ml Substratpuffer

Die Immunoblots wurden mit dem PhastSystem durchgeführt. Die Lösungen zur Entwicklung der Blots sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Nach der Gelelektrophorese (siehe 2.7.2) wurden die Pufferstreifen aus dem Pufferstreifenhalter entfernt und dieser wieder in die Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde auf 70°C geheizt. Eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) wurde zugeschnitten und 15 min in Reinstwasser äquilibriert. Dann wurde die Membran auf dem Trenngel positioniert und die Proteine 20 min bei 70°C aus dem Gel auf die Membran übertragen. Zur Ablösung der Membran vom Gel wurden beide für 2 min in Reinstwasser gegeben. Für den anschließenden Immunoblot wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht in Absättiger bei 4°C inkubiert. Die im Gel verbliebenen Proteine wurden nach erfolgtem Blot mit Coomassie oder Silber gefärbt

(siehe 2.7.2). Zur weiteren Entwicklung wurde die Membran 1 h mit der 1. AK-Lösung bei Raumtemperatur geschwenkt und dann zweimal mit Waschpuffer für je 10 min gewaschen. Danach wurde die 2. AK-Lösung auf die Membran gegeben, erneut 1 h geschwenkt und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Färbung mit der Substratlösung wurde die Nitrozellulose zweimal mit Substratpuffer gespült und dann die Substratlösung zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach ausreichender Entwicklungsdauer durch Spülen mit Reinstwasser gestoppt und die gefärbten Proteinbanden mit 3 % iger TCA fixiert. Nach Spülen mit Reinstwasser wurde die Membran getrocknet und zu Dokumentationszwecken fotografiert.

Rekombinante 6xHis-Proteine, die das Peptid Arg-Gly-Ser-His-His-His-His-His enthalten, können mit einem Maus anti-RGS(H)₄ Antikörper (Qiagen) und einem gegen Maus-Antikörper gerichteten und mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem Antikörper (Alkaline phosphatase-conjugated affinity pure goat anti-mouse IgG + IgM (H+L), Jackson ImmunoResearch, Dianova) aus Ziege im Immunoblot nachgewiesen werden.

Der GST-Anteil eines GST-Fusionsproteins wird mit einem polyklonalen Ziege Anti-GST Antikörper (goat anti-GST antibody, Pharmacia) und einem gegen Ziege-Antikörper gerichteten und mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem Kaninchen-Antikörper (Alkaline phosphatase-conjugated affinity pure rabbit anti-goat IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg) detektiert.

2.8 Aufreinigung der rekombinanten cytosolischen CHO-Sialidase aus *E. coli* Zellen

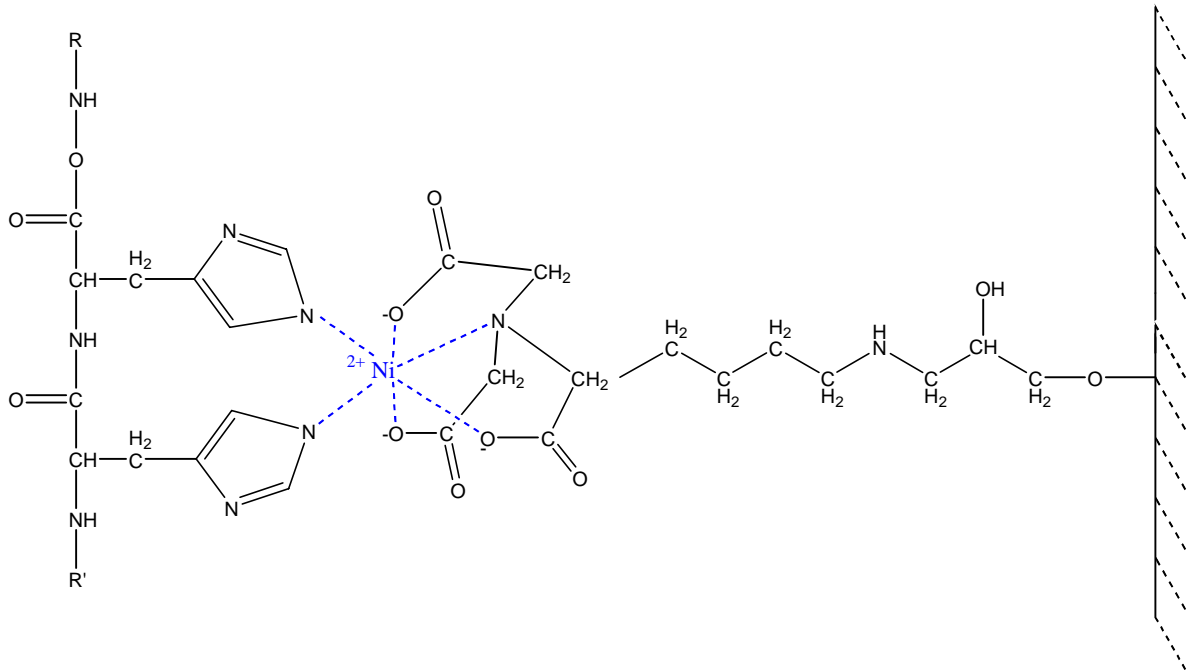


Abbildung 15: Interaktion zwischen benachbarten Resten des 6xHis-tag und der Ni-NTA-Matrix.

2.8.1 Affinitätsaufreinigung mit Nickel NTA Agarose

Proteine mit einem 6xHis-tag lassen sich mit Nickel-NTA (Nitrilotriacetic acid)-Agarose aufreinigen. Durch die starke Affinität der Bindung zwischen den Histidinen und dem Ni-NTA Rest ($K_d=10^{-13}$, pH 8,0) können ungebundene Proteine unter sehr schonenden Bedingungen, d.h. ohne die spezifische Bindung zwischen dem Fusionsprotein und der Affinitätsmatrix zu beeinträchtigen, ausgewaschen werden.

Die Affinitätsaufreinigung im analytischen Maßstab wurde mit den Zellsedimenten der small-scale Kultivierungen (siehe 2.6.2.1) durchgeführt [THE QIAEXPRESSIONIST, 1992].

Zu den Zellsedimenten wurden jeweils 200 μ l Lysepuffer (siehe Tabelle 18) gegeben und das Sediment vollständig resuspendiert. Die Suspension wurde 10 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Ni-NTA Agarose

wurde durch Schütteln resuspendiert und je 50 µl der Suspension zu den Überständen pipettiert. Nach einer Bindungsdauer von 30 min unter Schütteln wurden die Proben bei 13000 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Proteinen entfernt. Das Sediment wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen, dann mit 20 µl Elutionspuffer (siehe Tabelle 18) resuspendiert und 2 min geschüttelt. Das EDTA im Elutionspuffer bildet mit den Ni^{2+} Ionen der Affinitätsmatrix Chelate, so daß das Protein freigesetzt wird. Die Proben wurden bei 13000 g für 10 sec zentrifugiert und je 20 µl Überstand in Eppendorfgefäße überführt. Zu den Überständen wurden je 5 µl 5 fach konzentrierter SDS-Puffer pipettiert und 7 min auf 95°C erhitzt, die Proben bei 13000 g 10 min abzentrifugiert und die Überstände für die SDS-PAGE eingesetzt (siehe 2.7.2).

Tabelle 18: Pufferzusammensetzung für die Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung.

<i>Puffer</i>	<i>Substanzen</i>
Lysepuffer	0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
	0,1 M Na-Phosphat
	8 M Harnstoff
Waschpuffer	0,01 M Tris-HCl pH 6,3
	0,1 M Na-Phosphat
	8 M Harnstoff
Elutionspuffer	0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
	0,1 M Na-Phosphat
	8 M Harnstoff
	0,1 M EDTA

2.8.2 Affinitätsaufreinigung mit Glutathion Sepharose 4B

Fusionsproteine mit GST-Anteil können durch eine Affinitätsaufreinigung mit Glutathion Sepharose 4B (Pharmacia) schnell und schonend aus bakteriellen Lysaten isoliert werden (siehe Abbildung 16). Die GST bindet an die Glutathion Sepharose und kann nach dem Waschen durch Zugabe von reduziertem Glutathion von der Matrix wieder verdrängt werden, wobei Glutathion Sepharose 4B gleichzeitig regeneriert wird. Bei rekombinanten Fusionspartnern ohne Thrombinschnittstelle kann der GST-Anteil des Fusionsproteins proteolytisch abgespalten werden.

2.8.2.1 Affinitätsreinigung des Fusionsproteins aus small-scale Kulturen

Zunächst wurde die Glutathion Sepharose 4B je 2 mal mit PBS und PBS mit 1 % Triton X 100 gewaschen. Nach dem Zellaufschluß (siehe 2.6.3.1) wurden 50 µl gewaschene Glutathion Sepharose 4B zu den bakteriellen Lysaten gegeben und 45 min bei 4°C geschüttelt. Die Proben wurden bei 500 g 1 min zentrifugiert, die Überstände entfernt und die sedimentierte, beladene Glutathion Sepharose dreimal mit PBS mit 1% Triton X 100 und dann zweimal mit Tris-Puffer (0,125 M Tris-HCl pH 6,8) gewaschen. Zur sofortigen SDS-PAGE wurden je 25 µl doppelt konzentrierter SDS-Puffer zu 25 µl Sialidase-haltiger Lösung gegeben und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Inkubieren mit je 1 ml Elutionspuffer (50 mM Tris pH 8,0, 20 mM reduziertes Glutathion) wurde das Fusionsprotein in Lösung gebracht und die Glutathion Sepharose durch Zentrifugation bei 500 g (10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

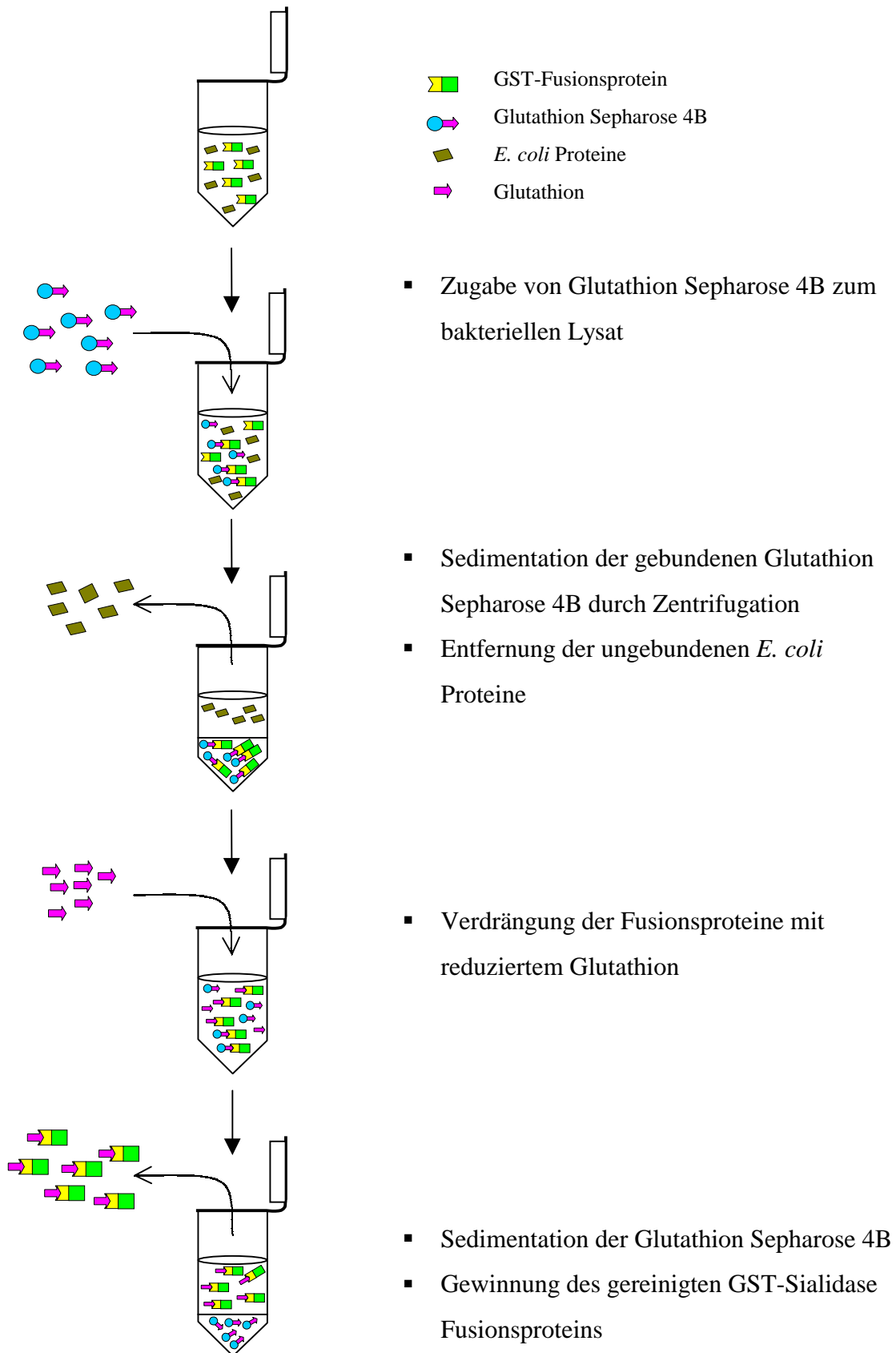


Abbildung 16: Schema der Affinitätsaufreinigung mit Glutathion Sepharose 4B

2.8.2.2 Affinitätsaufreinigung des Fusionsproteins aus Schüttelkolbenkulturen mittels Säulenchromatographie

Zur Säulenchromatographie wurden eine Amicon Moduline Säule mit 22 mm Durchmesser (Amicon, Witten) und eine Pharmacia C 26/40 Säule mit 26 mm Durchmesser (Pharmacia) verwendet. Die Säulen wurden mit 2-10 ml Säulenbettvolumen Glutathion Sepharose 4B gefüllt, wobei 1 ml gepacktes Säulenmaterial 1,33 ml suspendierter Glutathion Sepharose 4B entspricht.

Das FPLC System (Pharmacia), bestehend aus dem Controller LCC.501 Plus, zwei P-500 Pumpen, zwei Motorventilen MV-8, einem Injektions-Motorventil MV-7, einem Leitfähigkeitsmonitor, der optischen Einheit UV1 und einem Fraktionssammler Frac 100, wurde zur Säulenchromatographie eingesetzt. Die Säulen wurden an das System angeschlossen, dann mit dreifachem Säulenvolumen PBS pH 7,3 bei einem Durchfluß von 1 ml / min gewaschen und bei gleichem Durchfluß mit 5 fachem Säulenvolumen Äquilibrationpuffer (PBS pH 7,3, 1 % Triton X 100) äquilibriert.

Zur Auftragung des bakteriellen Lysats (siehe 2.6.3.2) wurde der Durchfluß auf 0,5 ml / min reduziert. Nach dem Beladen der eingesetzten Säule wurde das Säulenmaterial mit Äquilibrationpuffer und dann mit Trispuffer (50 mM Tris pH 8,0) bei einem Durchfluß von 1 ml / min gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (50 mM Tris pH 8,0, 20 mM reduziertes Glutathion) bei einem Durchfluß von 0,5 ml / min. Das Eluat wurde in 1-2 ml Fraktionen aufgefangen und bei -20°C gelagert.

2.8.2.3 Säulenchromatographische Affinitätsaufreinigung des Fusionsproteins aus der Fermentation im Bioreaktor

Im Gegensatz zu der Affinitätsreinigung der bakteriellen Lysate aus Schüttelkolbenkulturen wurde bei der Aufreinigung des Fusionsproteins aus den Fermentationslysaten die Glutathion Sepharose 4B zunächst mit dem Fusionsprotein beladen und erst dann in die Säule gegeben. Zur Aufreinigung wurden 10-20 ml Säulenbettvolumen Glutathion Sepharose 4B eingesetzt.

Das Säulenmaterial wurde zu dem bakteriellen Lysat gegeben und die Suspension in einem Schüttelkolben 60 min bei 25°C geschüttelt. Dann wurde die beladene Glutathion Sepharose 4B mit Hilfe eines Rundfilters vom Lysat getrennt und in eine Säule

überführt. Die Säulenchromatographie wurde wie unter Punkt 2.8.2.2 beschrieben an einer FPLC-Anlagen durchgeführt. Nach der Elution wurde das Säulenmaterial mit Phosphatpuffer oder Trispuffer (siehe 2.6.2.3) äquilibriert und erneut beladen. Die Beladung und Elution wurde zweimal wiederholt und die Eluate bei - 20°C gelagert.

2.8.2.4 Thrombinverdau von GST-Fusionsproteinen

Es wurden 5 U Thrombin (Pharmacia, Bulk and RediPack GST-Purification Modules) in 5 µl PBS mit 250 µl affinitätsgereinigtem GST-Fusionsprotein (446 µg / ml) gemischt. Nach Thrombinverdau (19 h) wurde die Probe mit SDS-Puffer gemischt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.7.2).

2.8.3 Ionenaustauschchromatographie

Zur Nachreinigung der Eluate wurde eine Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Dabei werden negativ geladene Gruppen des Proteins an freie, positiv geladene Gruppen des Ionentauschers gebunden. Die Auftrennung und Elution erfolgt durch die Veränderung des Ladungszustands des Proteins, d.h. durch Veränderung des pH-Werts oder durch Zugabe von konkurrierenden Ionen.

Für die Ionenaustauschchromatographie wurde eine Säule mit 10 mm Durchmesser (C 10/10, Pharmacia) verwendet. Die Säule wurde mit 2,66 ml frischer Q Sepharose FF in 20 % Ethanol (Pharmacia) gefüllt und an der FPLC-Anlage gepackt. Dabei entsprechen 1,33 ml suspendiertes Ionenaustauschmaterial 1 ml gepacktem Säulenbettvolumen. Q Sepharose FF enthält Trimethylaminoethyl-Gruppen (quaternäres Ammonium „Q“, $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), die an eine Agarosematrix (90 µm Partikel) gekoppelt sind.

Die Säule wurde mit dem 5 fachen Säulenvolumen Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 8,0) äquilibriert. Dann wurde das vereinigte Eluat aus der Affinitätschromatographie mit einer Flußrate von 1 ml / min aufgetragen und mit dem dreifachen Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Zur Auftrennung der gebundenen Proteine wurde bei gleichem Durchfluß zunächst ein linearer Salz-Gradient (0-150 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) mit einem Gesamtvolumen von 40 ml angelegt, dann die Salzkonzentration mit einem NaCl-Stufengradienten auf 300 mM erhöht und mit 15 ml Gesamtvolumen eluiert. Es wurden Fraktionen von je 2 ml gesammelt. Die Säule wurde mit 15 ml 50

mM Tris-HCl pH 8,0 mit 1 M NaCl regeneriert. Die Fraktionen mit Sialidaseaktivität (siehe 2.7.3.1) wurden vereinigt und bei -20°C gelagert.

2.8.4 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration konnten die in den Eluaten der Ionenaustauschchromatographie vorhandenen Proteine nach Molekülgröße aufgetrennt werden. Als Säulenmaterial wurde Superdex 200 PG (Pharmacia) verwendet. Dabei handelt es sich um Dextranketten, die kovalent an eine quervernetzte Agarosematrix gekoppelt sind. Die gequollene Matrix hat eine durchschnittliche Partikelgröße von $34\text{ }\mu\text{m}$. Je nach Größe können Moleküle verschieden tief in die Poren der Partikel eindringen. Kleine Moleküle brauchen daher länger, um durch die Säule zu wandern, während große Moleküle das Gelbett ungehindert passieren können. Der Einsatzbereich des Säulenmaterials für Molekültrennungen liegt zwischen 10 und 600 kDa.

Zur Gelfiltration wurde eine Superdex 200 PG 35/600 Säule (Pharmacia) mit einem Durchmesser von 35 mm eingesetzt. Die Säule wurde fertig gepackt mit 600 ml Säulenmaterial bezogen.

Zur Durchführung der Gelfiltration wurde die Säule an den Biopilot (Pharmacia) angeschlossen. Der Biopilot ist eine FPLC-Anlage für präparative Aufreinigungen, bestehend aus drei Pumpen (A, B, C), verschiedenen Motorventilen und einer Kontrolleinheit. Die Aufreinigung kann mit Hilfe eines pH-Meters, einer UV-Zelle und eines Leitfähigkeitsmeßgerätes verfolgt werden. Ein Fraktionssammler diente zum Auffangen der Eluate.

Nach dem Äquilibrieren der Säule mit dem 3 fachen Säulenvolumen 20 mM Phosphatpuffer pH 8,0 mit 150 mM NaCl bei einer Flußrate von 2 ml/min wurden die vereinigten Eluate der Ionenaustauschchromatographie bei einem Durchfluß von 4 ml/min aufgetragen und dann mit dem Phosphatpuffer bei gleicher Flußrate eluiert. Da die Säule ein Ausschlußvolumen von 190 ml und ein Totalvolumen von 585 ml besitzt [HAWERKAMP, 1998], wurde nach 40 min der Fraktionssammler gestartet und 60 Fraktionen mit einem Fraktionsvolumen von 8 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden bei -20°C gelagert.

2.9 Charakterisierung der GST-Sialidaseaktivität

2.9.1 Sialidase-Inhibitoren

N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) (Biomol, Hamburg) und 2-Deoxy-2,3-Dehydro-N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac2en) (Sigma) sind bekannte kompetitive Sialidase-Inhibitoren. Der inhibitorische Effekt von Neu5Ac und Neu5Ac2en auf die Aktivität der GST-Sialidase wurde in Reaktionsansätzen mit 0,203 mU Enzym und verschiedenen Inhibitorkonzentrationen getestet. Reaktionsansätze und Durchführung des Aktivitätstests sind unter 2.7.3.1 beschrieben.

2.9.2 Untersuchung der Sialidaseaktivität mit Gangliosiden aus humanen Granulozyten

Humane Granulozyten besitzen neben GM₃ ausschließlich Ganglioside der Neolactoserie [MÜTHING et al., 1993]. Diese Ganglioside stellen Lipid-gebundene, terminal sialylierte Oligosaccharide dar. Die gleichen Oligosaccharidketten sind als Protein-gebundene, terminal sialylierte Oligosaccharide bei Glykoproteinen zu finden. Zur Charakterisierung der Sialidase-Aktivität wurden aufgereinigte Ganglioside aus humanen Granulozyten eingesetzt [MÜTHING et al., 1996]. Die Fraktionen wurden nach Abreicherung von GM₃ als Standardgangliosidmischung [MÜTHING AND NEUMANN, 1993] von Herrn HD Dr J. Müthing (Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Lehrstuhl für Zellkulturtechnik) zur Verfügung gestellt. Die Hauptkomponenten dieser Standardmischung sind in Tabelle 19 aufgeführt. IV³- α -Neu5Ac-nLc₄Cer, IV⁶- α -Neu5Ac-nLc₄Cer und VI³- α -Neu5Ac-nLc₆Cer sind jeweils mit C16- und C24-Fettsäuren substituiert, die auf Dünnschichtchromatographie (DC)-Platten als Doppelbanden erscheinen. Die Substanzen lagen in Chloroform / Methanol (1:2, v/v) gelöst vor.

Tabelle 19: Strukturen der Neolacto-Serie-Ganglioside.

Bezeichnung	Struktur	Symbol
IV ³ - α -Neu5Ac-nLc ₄ Cer	Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3)Gal β (1-4)Glc β (1-1)Cer	IV ³ nLc ₄
IV ⁶ - α -Neu5Ac-nLc ₄ Cer	Neu5Ac α (2-6)Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3)Gal β (1-4)Glc β (1-1)Cer	IV ⁶ nLc ₄
VI ³ - α -Neu5Ac-nLc ₆ Cer	Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3)Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3)Gal β (1-4)Glc β (1-1)Cer	VI ³ nLc ₆

2.9.2.1 Analytische Trennung durch Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie

Die Standardgangliosidmischung wurde durch Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (High Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC) auf vorbeschichteten Dünnschichtchromatographie-Platten (Kieselgel 60 HPTLC-Fertigplatten, 10 cm x 10 cm, 0,2 mm Schichtdicke, Merck, Darmstadt) aufgetrennt [MÜTHING, 1996]. Dazu wurden die Proben mit einem automatischen Probenaufgeber (Linomat IV, Camag, Berlin) in Volumina von 5-10 μ l auf die jeweilige Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurde Chloroform / Methanol / Reinstwasser (120:85:20, v/v/v) mit 2 mM CaCl₂ verwendet. Die Laufzeit betrug jeweils 25 min.

2.9.2.2 Gangliosiddetektion mittels Overlay-Technik nach vorherigem Enzymabbau

Die Overlay-Technik ist eine einfache, schnelle und sensitive Methode, um die verschiedenen Oligosaccharidstrukturen von Glykosphingolipiden (GSL) zu untersuchen. Im Prinzip handelt es sich dabei um einen ELISA-Test auf der DC-Platte. Nach der chromatographischen Trennung der GSL werden die HPTCL-Platten mit dem Kunststoff Polyisobutylmethacrylat (Plexigum P28, Röhm, Darmstadt) überzogen, der die Ablösung des Kieselgels bei den folgenden Inkubationen mit wässrigen Lösungen von der Platte verhindert. Dabei bleiben die Zuckerstrukturen zugänglich für nachfolgende enzymatische Abbaureaktionen und Nachweisreaktionen mit einem spezifischen Antikörper (Overlay-Assay).

2.9.2.2.1 Plexigum-Beschichtung der HPTLC-Platten

Nach der Dünnschichtchromatographie wurden die HPTLC-Platten 1 h im Ölpumpenvakuum getrocknet und unmittelbar danach für ca. 45 min senkrecht in eine DC-Kammer mit Plexigum-Lösung (0,5 % Plexigum in wasserfreiem Hexan) gestellt. Gegebenenfalls wurde die Beschichtung wiederholt. Das unbeschichtete Kieselgel am oberen Plattenrand wurde entfernt und die Platten für den Overlay-Test waagrecht in Kunststoffkammern gelegt.

2.9.2.2.2 Overlay-Assay mit vorgeschaltetem Enzymabbau

Die hydrolytische Aktivität der GST-Sialidase gegenüber den gebundenen Neuraminsäuren der Einzelganglioside aus humanen Granulozyten wurde mit der Aktivität eines Referenz-Enzyms (*Vibrio cholerae*-Test-Neuraminidase, Behring Diagnostics, Marburg) verglichen.

Tabelle 20: Lösungen für den Enzym-Abbau und den Overlay-Assay.

Lösungen und Puffer	Substanzen
<i>V. cholerae</i>-Neuraminidase-Puffer	0,05 M Na-Acetat, pH 5,5 9 mM CaCl ₂
GST-Sialidase-Puffer	0,1 M Na-Acetat, pH 5,5
Lösung A	PBS 1 % BSA (Serva, Heidelberg) 0,02 % NaN ₃
Lösung B	PBS 0,05 % Tween 21, (ICI, Surfactands, Wilton, Middlesborough, Cleveland, U.K.) 0,02 % NaN ₃
Glycin-Puffer	100 mM Glycin, pH 10,4 1 mM ZnCl ₂ 1 mM Mg Cl ₂
BCIP-Lösung	Glycin-Puffer 0,05 % BCIP (5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat)

Vorbehandlung der beschichteten Platten:

- Inkubation mit je 40 ml PBS (siehe Tabelle 5) ü.N. bei 37°C

Enzym-Abbau der Standardgangliosidmischung:

- einmaliges Waschen mit dem entsprechenden Enzympuffer
- Inkubation mit verschiedenen Enzymkonzentrationen im jeweiligen Enzym-Puffer
- dreimaliges Waschen mit Lösung B

Overlay-Assay (je 40 ml Lösung pro Platte wurden eingesetzt):

- 10 min Absättigung mit Lösung A
- 1 h Inkubation mit Anti-Galβ(1-4)GlcNAc-R monoklonales Maus-IgM aus 1B2-1B7 Hybridoma Zellen (ATCC, TIB-189), (1:20 in Lösung A)
- dreimaliges Waschen mit Lösung B
- 1 h Inkubation mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem Ziege anti-Maus IgG und IgM (Dianova), (1:2000 in Lösung A)
- dreimaliges Waschen Lösung B
- einmaliges Waschen mit Glycin-Puffer
- Inkubation mit BCIP-Lösung bis zur deutlichen Bandenfärbung
- zweimaliges Waschen mit Glycin-Puffer
- Trocknen der HPTLC-Platte
- Dokumentation

2.9.2.3 Gangliosiddetektion mit Resorcin

Resorcin (Sigma) ist ein Reagenz, das spezifisch Sialinsäuren anfärbt und deshalb zur Detektion von Gangliosiden verwendet wird [SVENNERHOLM, 1957].

Resorcin-Gebrauchsreagenz:

- | | |
|------------------------------------|----------|
| • 2 % ige wässrige Resorcin-Lösung | 10 ml |
| • 0,1 M CuSO ₄ | 0,25 ml |
| • konz. HCl | 80 ml |
| • mit Reinstwasser | ad 100ml |

Die Lösung ist bei Lagerung im Dunkeln bei 4°C für ca. 2-3 Wochen stabil.

Der Nachweis der Ganglioside erfolgte nach der Auftrennung durch Besprühen der trockenen HPTLC-Platte mit dem Reagenz. Die Platte wurde mit einer Glasscheibe abgedeckt und 30 min bei 100°C entwickelt.

2.10 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen GST-Sialidase

2.10.1 Vorbereitung des Antigens

Die Fraktionen der Gelfiltration, die GST-Sialidase in hochgereinigter Form enthalten, wurden unter Verwendung von Microsep Mikrokonzentratoren (Filtron, Karlstein) aufkonzentriert. Dazu wurden die GST-Sialidase enthaltenden Gelfiltrationsfraktionen vereinigt. Vom Gesamtvolumen der Fraktionen (32 ml) wurde 1 ml Probe für Aktivitätsmessungen und Auftrennungen mittels SDS-PAGE entnommen. Die vereinigten Fraktionen wurden portionsweise in zwei Microsep Mikrokonzentratoren mit einer Ausschlußgrenze von 30 kDa gefüllt und 30 min bei 5000 g im SS-34 Rotor der RC-5C Zentrifuge zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Nach der Aufkonzentrierung wurde das Konzentrat mit ca. 10 ml Phosphatpuffer (20 mM Na-Phosphat pH 8,0, 150 mM NaCl) durch wiederholtes Auffüllen und Zentrifugieren der

Konzentratoren umgepuffert. Das resultierende Konzentrat besaß ein Endvolumen von ca. 1 ml und wurde in ein steriles Kryogefäß (NUNC, Wießbaden) gegeben. Der Proteingehalt der Probe wurde ermittelt (siehe 2.7.4) und die verbleibenden 900 µl an gereinigter GST-Sialidase bei -20°C gelagert.

2.10.2 Immunisierung eines Huhns mit gereinigter GST-Sialidase

Die Immunisierung von zwei Hühnern mit gereinigter GST-Sialidase wurde am Institut von Prof. Dr. U. Neumann (Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Geflügel) durchgeführt.

SPF (specific pathogen free)-Hühner wurden in Isolatoren aufgezogen [MÜTHING et al., 1991]. Vor der Immunisierung wurden für spätere Kontrollen Präimmunseren entnommen. Zwei Hühner im Alter von 12 Wochen wurden mit hochreiner GST-Sialidase aus einer 25 Liter Fermentation (siehe 2.8.4) immunisiert. Das Antigen wurde mit gleichem Volumen FCA (Freund's complete Adjuvant) gemischt und an verschiedenen Stellen intramuskulär injiziert. Nach 4 Wochen wurde Immunserum entnommen und die Hühner mit affinitätsgereinigter GST-Sialidase aus einem 1 Liter Ansatz (siehe 2.8.2.2) nachimmunisiert. Nach weiteren 14 Tagen wurden die Hühner geschlachtet und die Immunseren bei -20°C gelagert.

2.10.3 Spezifitätsnachweis der Immunseren gegen GST-Sialidase

Die Spezifität der Immunseren wurde in Immunoblots, wie unter Punkt 2.7.5 beschrieben, getestet. Als 1. AK-Lösung wurden die Präimmunseren und Immunseren in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Als 2. AK diente ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Kaninchen Anti-Huhn Antikörper (Alkaline phosphatase-conjugated affinity pure rabbit anti-goat IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg). Detektiert wurde GST-Sialidase in elektrophoretisch aufgetrennten und auf eine Membran übertragenen bakteriellen Lysaten (siehe 2.6.3) und affinitätschromatographisch aufgereinigte GST-Sialidase.

3 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnisteil gliedert sich in sieben Abschnitte.

Der erste Abschnitt umfaßt die Entwicklung einer RT PCR, die Subklonierung der Sialidase kodierenden cDNA in den pCR 2.1 Vektor und die Klonierung des Sialidase-Inserts in die Expressionsvektoren pQE 16, pQE 60 und pQE 31 (siehe 3.1). Zuerst wurden zwei Methoden der RNA-Isolierung miteinander verglichen und eine zur RNA-Isolierung aus CHO-Zellen ausgewählt. Die isolierte RNA wurde mittels Reverser Transkription in die Sialidase-kodierende cDNA umgeschrieben. Durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit verschiedenen Primerpaaren und unterschiedlichen Annealingtemperaturen wurden mit zwei Polymerasen Sialidase-kodierende PCR-Produkte amplifiziert. Der Einsatz von degenerierten Primern führte zu einem Einbau von Restriktionsschnittstellen an den Sequenzenden der PCR-Produkte. Zur Vermehrung der cDNA und um das Insert vor der enzymatischen Degradation durch Exonukleasen zu schützen, wurden die Sialidasesequenzen in pCR 2.1 Vektoren subkloniert. Die aus den pCR 2.1 Vektoren isolierten Sialidase-Sequenzen wurden entsprechend ihren Schnittstellen mit den linearisierten Expressionsvektoren pQE 16, pQE 60 und pQE 31 kloniert. Mit den klonierten Sequenzen wurden *E. coli* Zellen transformiert. Die erfolgreich transformierten Klone wurden ermittelt und zur Expression eingesetzt.

Der zweite Abschnitt beinhaltet die Ergebnisse der Expressionsanalysen (siehe 3.2). Gesamtproteinextrakte und affinitätschromatographisch aufgereinigte Lysate aus erfolgreich transformierten, induzierten Klonen, aus nicht-induzierten Klonen und aus nicht-transformierten *E. coli* Zellen wurden zu diesem Zweck mittels SDS-PAGE aufgetrennt und miteinander verglichen. Durch den Vergleich der Proteinbanden wurde ermittelt, welche Klone ein Fusionsprotein exprimieren und in welcher Form das Protein vorliegt. Ob es sich bei dem exprimierten, löslichen Sialidase-Fusionsprotein um ein aktives Enzym handelt, konnte durch Messung der Sialidase-Aktivität mit MUF-Neu5Ac in bakteriellen Lysaten nachgewiesen werden. Ein positiver Klon wurde für die Produktion des Sialidase-Fusionsproteins ausgewählt.

Der dritte Teil beschreibt die Optimierung der Induktionsparameter zur Produktion eines löslichen und aktiven rekombinanten Sialidase-Fusionsproteins (siehe 3.3). Der Einfluß der Induktionstemperatur, Induktionsdauer, IPTG-Konzentration und Zelldichte bei Induktionsstart auf die Expression des Sialidase-Fusionsproteins wurde untersucht. Nach unterschiedlichen Induktionszeiten wurden affinitätschromatographisch gereinigte Lysate des Klons pGEX-2T-S1 gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch den Vergleich der Proteinbanden konnte geklärt werden, inwieweit eine erhöhte Induktionsdauer einen Einfluß auf die Expression des Fusionsproteins hat. Die Proteinkonzentration und die Sialidaseaktivität in bakteriellen Lysaten des Klons pGEX-2T-S1 wurde, nach Induktion unter verschiedenen Bedingungen, gemessen. Die Induktionsparameter, die zu hohen Proteinkonzentrationen und Sialidaseaktivitäten führten, wurden zur Produktion des Sialidase-Fusionsproteins ausgewählt.

Die Kultivierung des Klons pGEX-2T-S1 in Schüttelkolben und im Bioreaktor wird im vierten Abschnitt behandelt (siehe 3.4). Dieser Abschnitt befaßt sich mit der Maßstabsvergrößerung von zunächst 250 ml Kulturvolumina in Schüttelkolben auf 25 Liter im Bioreaktor. Die zuvor ermittelten Daten zur Produktion des GST-Sialidase Fusionsproteins wurden auf einen größeren Maßstab übertragen. Zunächst wurde die Zunahme der Zelldichte während des Kulturverlaufs in vier parallelen Schüttelkolbenansätzen und in zwei 25 Liter Fermentationen des Klons pGEX-2T-S1 gemessen. Die Wachstumskurven umfassen jeweils den Kulturverlauf vor und nach der Induktion. Dann wurden die Wachstumskurven miteinander verglichen. Die Wachstumsverläufe sollten durch die Maßstabsvergrößerung nicht beeinflußt werden.

Der fünfte Abschnitt beschreibt die Aufreinigung des GST-Sialidase Fusionsproteins (3.5). Verschiedene Affinitätsaufreinigungen der GST-Sialidase aus 250 ml und 1 Liter Ansätzen dienten als Vorversuche für die Aufreinigung aus 25 Liter Ansätzen. Das in verschiedenen Schüttelkolbenansätzen produzierte GST-Sialidase Fusionsprotein wurde über Glutathion Sepharose 4B Affinitätssäulen aufgereinigt. Als Beispiele wurden erstens Protein- und Aktivitätsmessungen der affinitätschromatographischen Aufreinigung der GST-Sialidase aus einem 250 ml Ansatz dokumentiert und die Ausbeute berechnet, zweitens wurden die verschiedenen Eluat-Fractionen der

Aufreinigung aus einem 1 Liter Ansatz mittels SDS-PAGE dargestellt und drittens das Elutionsprofil der Aufreinigung aus einem zweiten 1 Liter Ansatz aufgenommen.

Nach den Vorversuchen wurde die GST-Sialidase aus zwei 25 Liter Fermentationen (Fermentation 1 und Fermentation 2) mittels Glutathion Sepharose Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Aufreinigung mittels SDS-PAGE, Immunoblotting, Protein- und Aktivitätsmessung dokumentiert. Die GST-Sialidase aus Fermentation 1 wurde mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration nachgereinigt. Das nachgereinigte Produkt wurde als Antigen zur Herstellung eines Immunsersums eingesetzt. Die in der zweiten Fermentation produzierte GST-Sialidase stand für die weiteren biochemischen Charakterisierungen zur Verfügung.

Die Charakterisierung der Enzymaktivität und Substratspezifität der GST-Sialidase ist Thema des sechsten Abschnitts (siehe 3.6). Zur Charakterisierung der Aktivität der GST-Sialidase wurden zwei verschiedene Sialidase-Inhibitoren eingesetzt. Die Sialidaseaktivität unter dem Einfluß der Inhibitoren wurde mit MUF-Neu5Ac gemessen. Dabei sollte nachgewiesen werden, ob die Hemmung der GST-Sialidase-Aktivität mit den Literaturdaten für cytosolische Sialidase aus Rattenleber übereinstimmt.

Zur Charakterisierung der Enzymspezifität wurde der enzymatische Abbau von Gangliosiden aus humanen Granulozyten durch GST-Sialidase und durch das Referenzenzym *V. cholerae* Neuraminidase untersucht. Da die aus humanen Granulozyten aufgereinigten terminal sialylierten, Lipid-gebundenen Oligosaccharide identisch mit Protein-gebundenen, terminal sialylierten Kohlenhydratseitenketten sind, lassen sich durch den Vergleich der Enzymreaktionen Rückschlüsse auf die Desialylierung von Glykoproteinen durch GST-Sialidase ziehen.

Der letzte Abschnitt umfaßt die Herstellung von polyklonalen Antikörpern in Hühnern (siehe 3.7). Hochreine GST-Sialidase wurde für die Erstimmunisierung eingesetzt und affinitätschromatographisch aufgereinigte GST-Sialidase wurde zur Nachimmunisierung verwendet. Um das Immunesum im Immunoblot zu testen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Lysate und affinitätschromatographisch gereinigte GST-Sialidase aus Klon pGEX-2T-S1, Klon pGEX-2T-S7 und nicht-transformierten *E. coli* Zellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden parallele Immunoblots mit dem Präimmunesum durchgeführt.

3.1 Klonierung der cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen

Für die Bereitung der Sialidase cDNA durch Reverse Transkription wurde RNA aus CHO-Zellen isoliert. Zwei verschiedene Methoden wurden zur RNA Isolierung aus CHO K1 Zellen eingesetzt und verglichen. CHO K1 Zellen werden zur Herstellung rekombinanter Zelllinien, wie z.B. CHO SS3 A2 verwendet. Eine RT PCR-Methode zur Amplifikation von Sialidase cDNA wurde entwickelt. Drei unterschiedliche Primerpaare wurden verwendet, um Restriktionsschnittstellen an den Enden der PCR-Produkte einzufügen.

Durch Subklonierung der PCR-Produkte in pCR 2.1 Vektoren wurde die Sialidase cDNA vermehrt und der enzymatische Abbau der RT PCR-Produkte durch Exonukleasen verhindert. Zur Transformation wurden *E. coli* Inf α F⁻ Zellen eingesetzt. Die Sialidase kodierenden Sequenzen aus den pCR 2.1 Vektoren wurden unter Verwendung der eingefügten Schnittstellen in die Expressionsvektoren pQE16, pQE60 und pQE31 kloniert. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* M15 pREP4 eingesetzt.

3.1.1 RNA-Isolierung aus CHO-Zellen

Um RNA in vergleichbarer Menge und Qualität aus verschiedenen CHO-Zellen isolieren zu können, wurden nach der Methode von CHOMCZYNSKI UND SACCHI (1987) und mit dem RNeasy Total RNA Kit (Qiagen) je zwei parallele RNA-Isolierungen durchgeführt. Als Spenderorganismen wurden jeweils gleiche Mengen an CHO K1 Zellen eingesetzt. Die gereinigten RNA-Isolate wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung gefärbt (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18).

Cytoplasmatische RNA aus Eukaryonten besteht zu ca. 95 % aus ribosomaler RNA, die sich aus 28S-, 18S- und 5S-RNA zusammensetzt. Bei qualitativ hochwertigen RNA Präparationen laufen die 28S- und die 18S-RNA-Moleküle in zwei scharfen, definierten Banden, die als interne Marker dienen können.

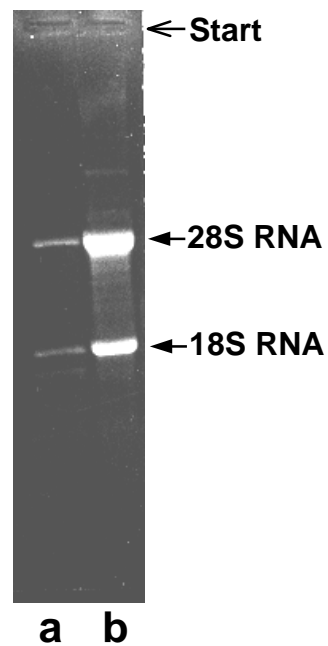


Abbildung 17: Agarosegelelektrophorese von zwei nach CHOMCZYNSKI AND SACCHI (1987) parallel aufgearbeiteten RNA-Isolaten aus CHO K1 Zellen (a und b). Die Isolate wurden in einem 1 % igem Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

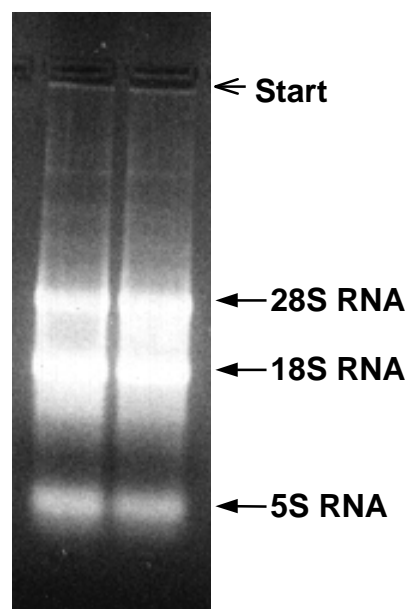


Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese von zwei mit dem RNeasy Total RNA Kit parallel aufgearbeiteten RNA-Isolaten aus CHO K1 Zellen. Die Isolate wurden in einem 1,3% igem Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Die 28S- und die 18S-RNA Banden sind in beiden Agarosegelen deutlich sichtbar. Die 5S-RNA Bande konnte nur in RNA-Präparationen des Kits identifiziert werden. Obwohl die RNA-Isolierungen nach CHOMCZYNSKI UND SACCHI parallel durchgeführt wurden, sind die Banden des einen RNA-Isolats (siehe Abbildung 17,b) viel intensiver als die des Parallelansatzes (siehe Abbildung 17,a). In Gegensatz dazu zeigten sich bei den Auftrennungen der mit dem RNeasy Total RNA Kit parallel aufgereinigten RNA-Isolate (siehe Abbildung 18) keine Unterschiede. Der RNeasy Total RNA Kit ist zur Isolierung von RNA besser geeignet als die Methode von CHOMCZYNSKI AND SACCHI. Die RNA-Isolierung nach der Methode von CHOMCZYNSKI AND SACCHI ist sehr zeitaufwendig und die RNA-Isolate unterschieden sich hinsichtlich der aufgereinigten Mengen. Die RNA-Isolierung mit dem Total RNeasy RNA Kit ist dagegen eine sehr schnelle Methode, die die Aufreinigung reproduzierbarer Mengen an RNA ermöglicht. Für weitere RNA Präparationen aus unterschiedlichen CHO-Zellen wurde daher der Total RNA Kit eingesetzt.

3.1.2 Entwicklung einer RT PCR Methode

Für die RT PCR wurden RNA-Isolate aus CHO K1 und zusätzlich aus CHO HC II Klon 6 und aus CHO SS3 A2 Zellen verwendet.

Bei CHO HC II Klon 6 Zellen handelt es sich um rekombinante Zellen, die rekombinanten humanen Heparin Cofaktor II (rhHC II) produzieren. Diese Zellen wurden ausgewählt, weil sie die bekannte Sequenz für HC II enthalten. Mit dem Primerpaar Dag 50 / Dag 70 kann ein 567 bp Fragment der HC II kodierenden Sequenz amplifiziert werden. Der Nachweis der HC II kodierenden Sequenz diente als Referenz für die erfolgreiche Amplifikation. RNA-Isolate aus CHO HCII Klon 6 Zellen wurden als Positivkontrolle der RT PCR verwendet.

Die Zelllinie CHO SS3 A2 produziert rekombinantes humanes Antithrombin III. In dieser Zelllinie konnte Sialidaseaktivität im Überstand nachgewiesen werden. Die Sialidase-kodierende cDNA wurde mit den in Tabelle 21 aufgeführten Primerpaaren mittels RT PCR amplifiziert. Anhand der von FERRARI et al. (1994) veröffentlichten cDNA Sequenz der cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen wurden die beschriebenen Primer ausgewählt (siehe Abbildung 5). Die zur Amplifikation der Sialidase cDNA eingesetzten Primerpaare CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12, CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42 und CHOSIAL 51 / CHOSIAL 52 führten zum Einbau zusätzlicher Schnittstellen an den

Enden der RT PCR-Produkte (siehe 2.3.2). Die Schnittstellen wurden eingefügt, um die Fragmente in Expressionsvektoren klonieren zu können.

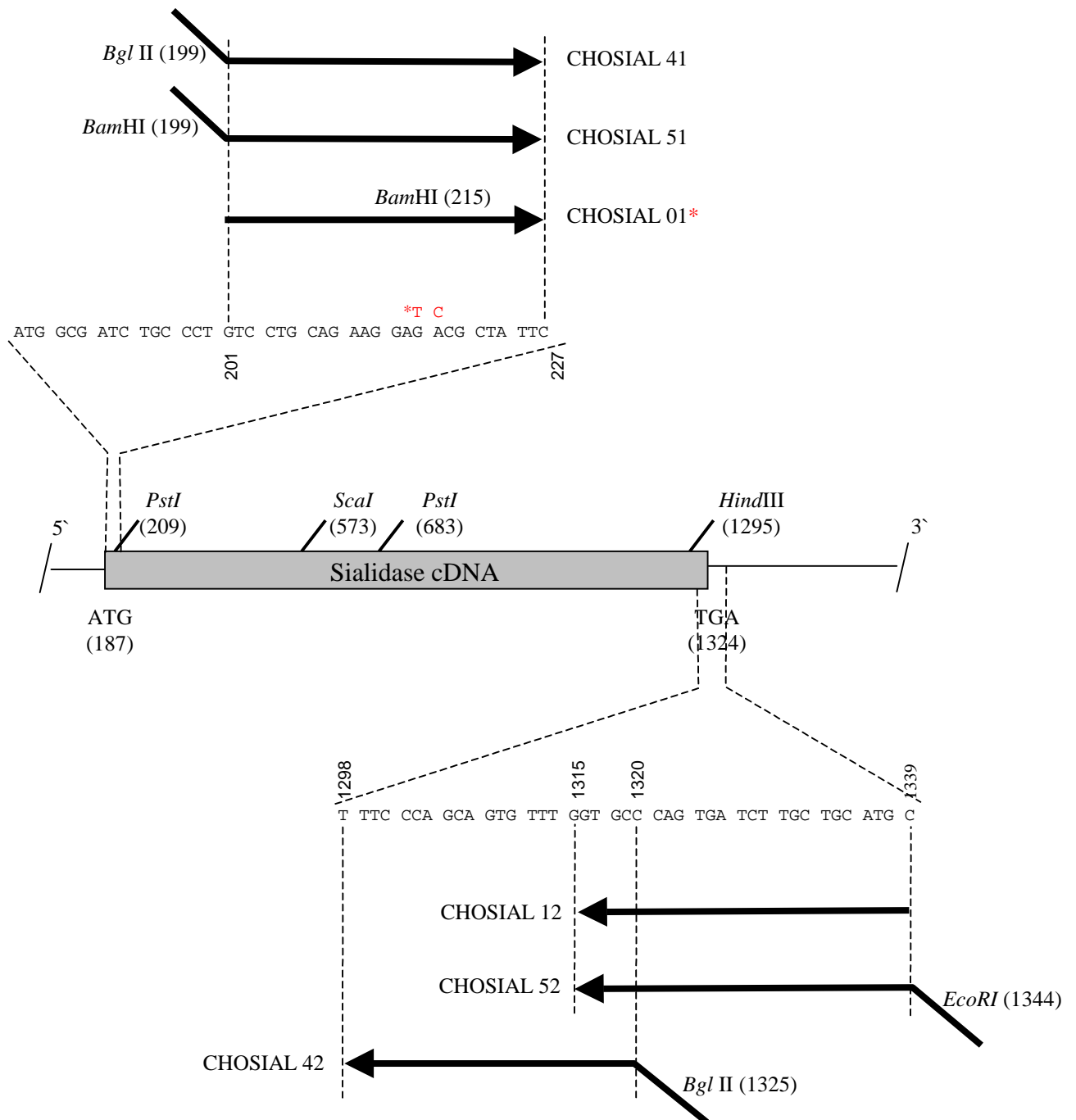


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Sialidase cDNA mit Start- und Stoppcodon, relevanten Restriktionsschnittstellen und den Primerpositionen der Primerpaare CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12, CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42 und CHOSIAL 51 / CHOSIAL 52 (siehe Tabelle 21).

In Tabelle 21 sind die eingefügten Schnittstellen und die theoretisch ermittelten Fragmentgrößen der aus den Primerpaaren resultierenden PCR-Produkte aufgeführt.

Tabelle 21: Zu erwartende RT PCR Sialidase cDNA-Fragmente der drei Primerpaare.

sense	CHOSIAL 01	CHOSIAL 41	CHOSIAL 51
antisense	CHOSIAL 12	CHOSIAL 42	CHOSIAL 52
RT PCR Produkt	1136 bp	1148 bp	1158 bp
Restriktionsschnittstellen	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	<i>Bgl</i> /II / <i>Bgl</i> /II	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI

Bei der Auswahl der Annealingtemperatur sind zwei Aspekte entscheidend. Eine zu geringe Temperatur führt zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte, während zu hohe Temperaturen die spezifische Anlagerung der Primer erschweren und so die Produktausbeute senken. Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur wurde die RT PCR bei drei verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt. Bei der PCR wurden die Primer CHOSIAL 01 und CHOSIAL 12, AmpliTaq Polymerase und RNA Isolat aus CHO HC II Klon 6 eingesetzt. Je 10 µl der PCR-Produkte wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr-Lösung gefärbt (siehe Abbildung 20).

Das Sialidase cDNA-Fragment mit einer Größe von 1136 bp wurde bei 63°C, 65°C und bei 68°C amplifiziert. Dabei hatten die unterschiedlichen Temperaturen nur geringen Einfluß auf die Amplifikation. Bei allen getesteten Temperaturen wurden neben der Sialidase cDNA unspezifische Fragmente gebildet.

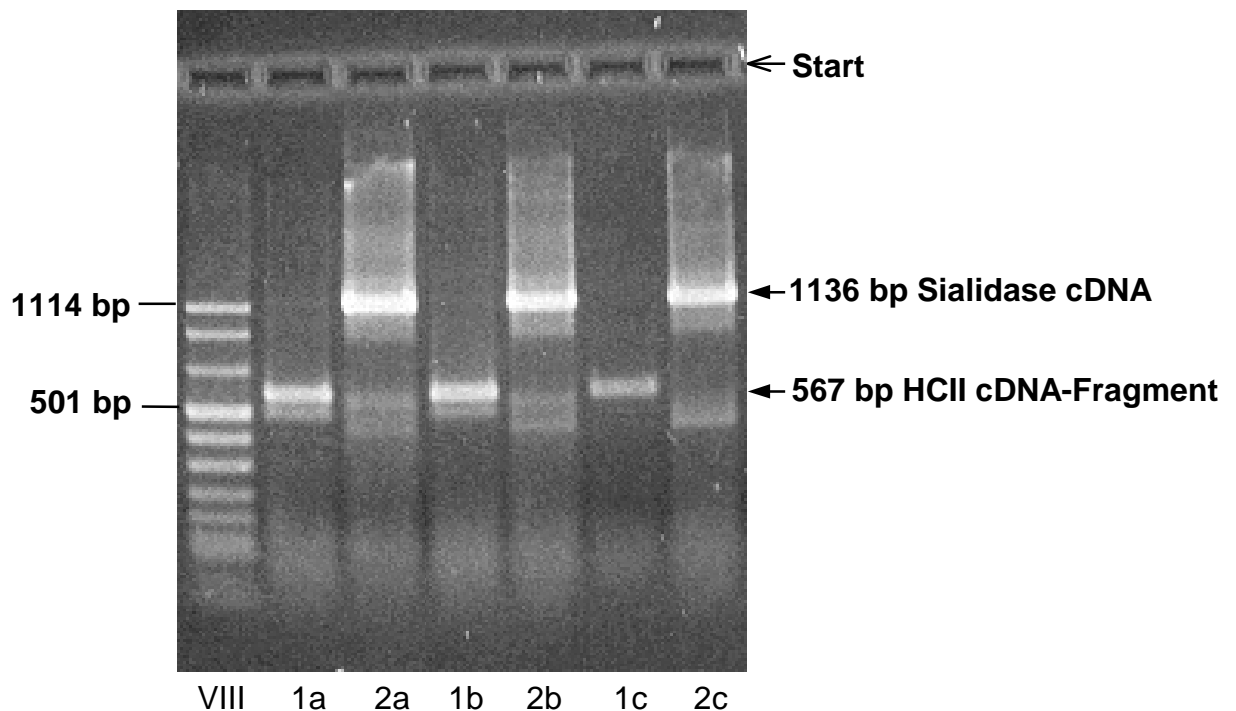


Abbildung 20: Agarosegelelektrophorese der RT PCR-Produkte, die bei Annealingtemperaturen von 63°C (a), 65°C (b) und 68°C (c) gebildet wurden. Die RT PCR wurde mit RNA aus CHO HC II Klon 6, mit den Primern CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12 und mit AmpliTaq Polymerase durchgeführt. 1, 567 bp PCR-Produkt einer HC II kodierenden Sequenz; 2, 1136 bp Fragment der Sequenz der cytosolischen Sialidase; VIII, Längenstandard 19-1114 bp. Die PCR-Produkte wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Die RT PCR wurde ein zweites Mal bei 66°C, 68°C und 70°C Annealingtemperatur durchgeführt, um die Bildung unspezifischer Produkte zu verringern. Bei dieser RT PCR mit AmpliTaq Polymerase wurde wieder das Primerpaar CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12 und zusätzlich das Primerpaar CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42 eingesetzt. Statt RNA aus CHO HC II Klon 6 wurde RNA-Isolat aus CHO K1 verwendet. Je 10 µl der PCR-Produkte wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr-Lösung gefärbt (siehe Abbildung 21).

Bei allen Annealingtemperaturen wurde sowohl die 1136 bp Sialidase cDNA des Primerpaares CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12 als auch die 1146 bp Sialidase cDNA des Primerpaares CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42 gebildet. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 70°C führte nicht zur Vermeidung unspezifischer Banden. Daher wurde für alle weiteren Versuche die Annealingtemperatur auf 68°C festgesetzt.

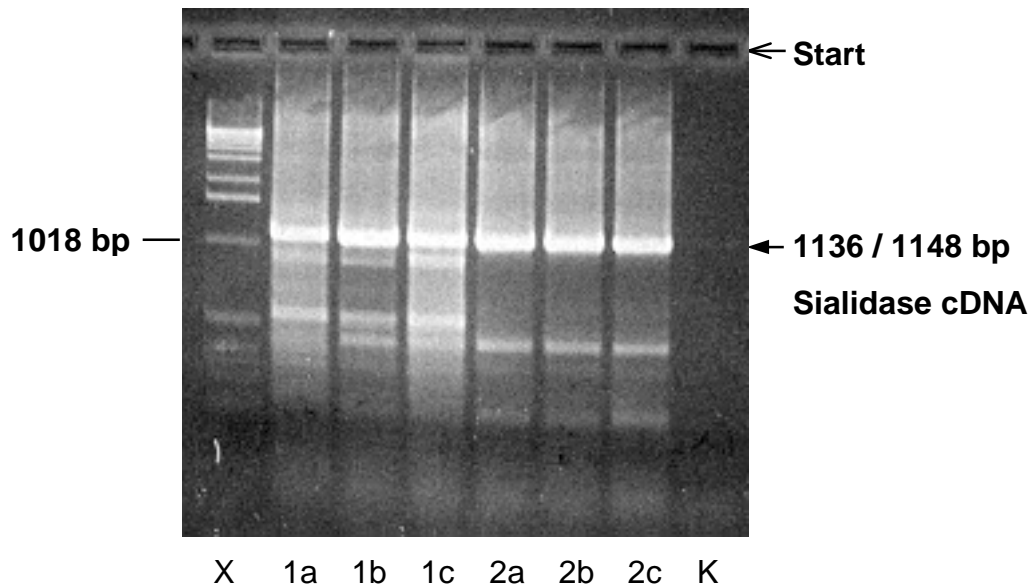


Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese der RT PCR-Produkte, die bei 66°C Annealingtemperatur (a), 68°C Annealingtemperatur (b) und 70°C Annealingtemperatur (c) gebildet wurden. Die RT PCR wurde mit RNA aus CHO K1 Zellen, mit den Primerpaaren CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12 (1) und CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42 (2) mit AmpliTaq Polymerase durchgeführt. 1, 1136 bp Sialidase cDNA; 2, 1148 bp Sialidase cDNA; K, Negativkontrolle; X, Längenstandard 0,07-12,2 kbp. Die PCR-Produkte wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Der Einsatz von Taq Polymerasen führt zum Einbau von Desoxyadenosinen an den 3'-Enden der PCR-Produkte. Diese endständigen Desoxyadenosine sind zur Klonierung der Produkte in pCR 2.1 Vektoren notwendig (siehe Abbildung 8). Dagegen werden bei Verwendung von Pfu Polymerasen PCR-Produkte mit glatten Enden (blunt-end) und geringerer Fehlerfrequenz amplifiziert. Aus diesem Grund wurde in den Versuchen

sowohl Taq als auch Pfu Polymerase eingesetzt. In einem dritten RT PCR Versuch wurde statt AmpliTaq Polymerase die Synergy Polymerase eingesetzt. Synergy Polymerase ist eine Mischung aus Taq und Pfu Polymerase. Bei dieser RT PCR wurden die Primerpaare CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42 und CHOSIAL 51 / CHOSIAL 52 verwendet. Die PCR wurde mit RNA aus CHO SS3 A2 bei einer Annealingtemperatur von 68°C durchgeführt. Je 10 µl der PCR-Produkte wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr-Lösung gefärbt (siehe Abbildung 22).

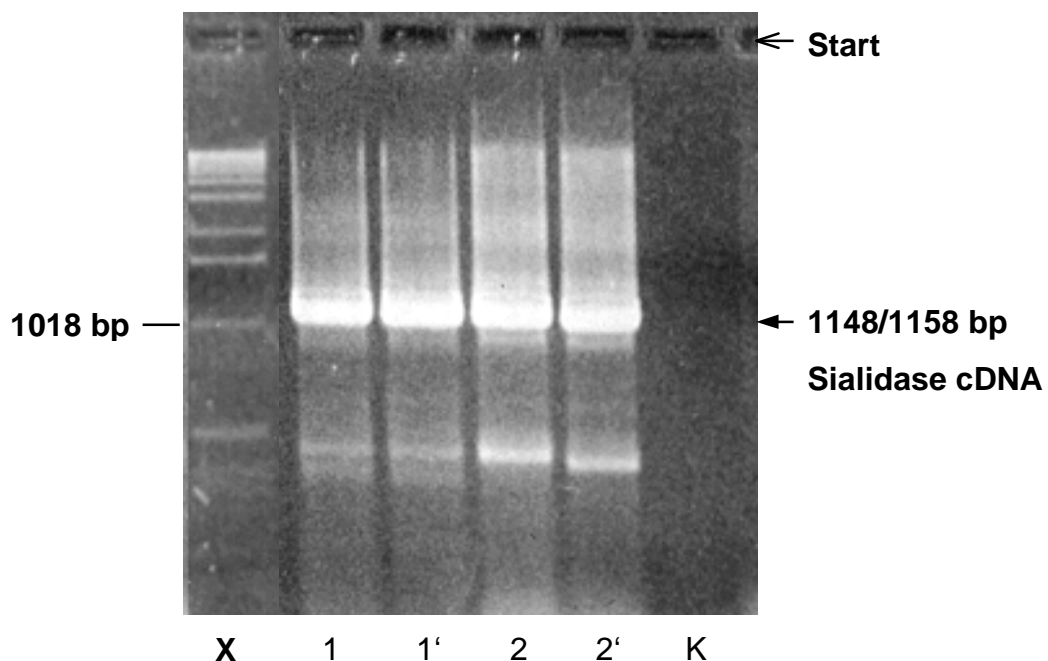


Abbildung 22: Agarosegelelektrophorese der RT PCR-Produkte, die mit Synergy Polymerase gebildet wurden. Die RT PCR wurde mit RNA aus CHO SS3 A2 Zellen, mit den Primerpaaren CHOSIAL 51 / CHOSIAL 52 (1) und CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42 (2) jeweils in doppelten Ansätzen bei einer Annealingtemperatur von 68°C durchgeführt. 1 und 1', 1158 bp Sialidase cDNA; 2 und 2', 1148 bp Sialidase cDNA; K, Negativkontrolle X, Längenstandard 0,07-12,2 kbp. Die PCR-Produkte wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Sowohl die AmpliTaq Polymerase als auch die Synergy Polymerase katalysieren die Amplifikation des Sialidase-kodierenden cDNA-Fragments. Beim Einsatz der unterschiedlichen Polymerasen konnten keine Unterschiede in den PCR-Produkten festgestellt werden. In den weiteren Versuchen wurden je nach Bedarf Taq und Pfu Polymerasen eingesetzt.

In den beschriebenen RT PCR Versuchen wurden RNA Präparationen aus CHO K1, CHO SS3 A2 und aus CHO HC II Klon 6 eingesetzt. Die RT PCR mit RNA aus unterschiedlichen CHO-Zellen führte zu identischen RT PCR-Produkten, d.h. daß die Sialidase Sequenz nicht nur in der Elternzelllinie CHO K1, sondern auch in den genetisch veränderten CHO K1-Abkömmlingen CHO SS3 A2 und CHO HCII Klon 6 vorhanden ist.

Mit den verwendeten Primerpaaren konnten die in Tabelle 21 aufgeführten Sialidase cDNA-Fragmente amplifiziert werden.

3.1.3 Subklonierung der Sialidase cDNA RT PCR-Produkte in den Vektor pCR 2.1

Die amplifizierten Sialidase cDNA-Fragmente wurden mit dem Original TA Cloning Kit (siehe 2.4) in den pCR 2.1 Vektor subkloniert. Diese Technik ermöglicht die Klonierung der RT PCR-Produkte ohne weitere Aufreinigungsschritte, so daß die Produkte durch Vermehrung des Vektors in den Subklonen in großer Menge zur Verfügung stehen und vor dem Verdau durch Exonukleasen geschützt sind.

Tabelle 22: Bezeichnungen der Vektoren und Klone der Transformationen 1, 3 und 6 mit dem pCR 2.1 Vektor mit Sialidase cDNA-Insert.

<i>Transformation</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>6</i>
<i>Primerpaar</i>	CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12	CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42	CHOSIAL 51 / CHOSIAL 52
<i>Insert</i> <i>(RT PCR Produkt)</i>	1136 bp Sialidase cDNA	1148 bp Sialidase cDNA	1158 bp Sialidase cDNA
<i>Restriktionsschnittstellen</i>	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	<i>Bg</i> II / <i>Bg</i> II	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI
<i>Vektor</i> <i>(pCR 2.1 + Insert)</i>	pMBU1	pMBU3	pMBU6
<i>getestete Subklone</i>	Klon pMBU1-01 bis Klon pMBU1-10	Klon pMBU3-01 bis Klon pMBU3-10	Klon pMBU6-01 bis Klon pMBU6-03
<i>Subklon</i> <i>mit Insert</i>	Klon pMBU1-02 Klon pMBU1-10	Klon pMBU3-06 Klon pMBU3-09	Klon pMBU6-02
<i>isoliertes Plasmid</i> <i>mit Insert</i>	pMBU1-02 pMBU1-10	pMBU3-06 pMBU3-09	pMBU6-02

Für die Transformation wurden die im Kit vorhandenen *E. coli* Inf α F' Zellen eingesetzt. Nach der Ligation der RT PCR-Produkte in pCR 2.1 Vektoren und der Transformation der *E. coli* Zellen, wurden aus verschiedenen Subklonen die Plasmide isoliert, mit Endonukleasen verdaut und auf Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurden sowohl die mit

Hilfe der Primer eingefügten Schnittstellen der RT PCR-Produkte, als auch die *EcoRI*-Schnittstellen der mcs (multiple cloning site) des pCR 2.1 Vektors (siehe Abbildung 8) verwendet. Aus drei von sechs Transformationen konnten Subklone ermittelt werden, die einen pCR 2.1 Vektor mit Sialidase cDNA-Insert enthielten (siehe Tabelle 22). Da die Sialidase cDNA-Inserte außer den flankierenden Schnittstellen noch jeweils eine Schnittstelle für *ScaI* und für *HindIII* enthalten (siehe Abbildung 19), entstehen beim Verdau der Inserte mit diesen Enzymen definierte Fragmente, die im Agarosegel aufgetrennt werden können.

Tabelle 23: Definierte Restriktionsfragmente der Sialidase cDNA RT PCR-Produkte.

Transformation	1	3	6
Primerpaar	CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12	CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42	CHOSIAL 51 / CHOSIAL 52
Sialidase cDNA RT PCR- Produkt im pCR 2.1 Vektor	1136 bp	1148 bp	1158 bp
eingesetzte Endonuklease	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>
resultierendes Restriktionsfragment	1151 bp	1163 bp	1162 bp
eingesetzte Endonukleasen	<i>BamHI</i> / <i>HindIII</i>	<i>Bgl</i> II	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
resultierendes Restriktionsfragment	1080 bp	1129 bp	1142 bp
eingesetzte Endonukleasen	<i>BamHI</i> / <i>HindIII</i> / <i>Scal</i>	<i>Bgl</i> II / <i>Scal</i>	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i> / <i>Scal</i>
resultierende Restriktionsfragmente	722 bp 358 bp	755 bp 374 bp	767 bp 375 bp

Die Plasmide aus 10 Subklonen (Klon pMBU1-01 bis Klon pMBU1-10) der Transformation 1 (siehe Tabelle 22) wurden mit *EcoRI* verdaut und die Restriktionsfragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Die berechnete Länge des Sialidase cDNA-Fragments beträgt 1151bp (siehe Tabelle 23). Nach *EcoRI*-Verdau wurde das Fragment in den Plasmiden pMBU1-02 und pMBU1-10 nachgewiesen (siehe Abbildung 23).

Die Plasmide aus 10 Subklonen (Klon pMBU3-01 bis Klon pMBU3-10) der Transformation 3 (siehe Tabelle 22) wurden ebenfalls mit *EcoRI* verdaut und die Restriktionsfragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Die berechnete Länge des Sialidase cDNA-Fragments beträgt 1163 bp (siehe Tabelle 23). Nach *EcoRI*-Verdau wurden das Fragment in den Plasmiden pMBU3-06 und pMBU3-09 nachgewiesen (nicht gezeigt).

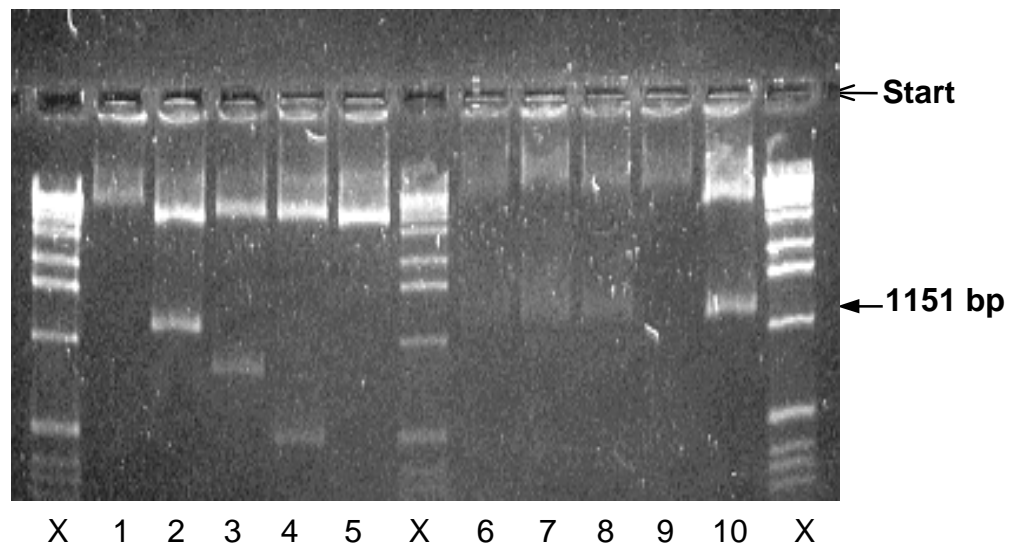


Abbildung 23: Agarosegelelektrophorese von Plasmiden aus den *E. coli* In α F^r Subklonen pMBU1-01 bis pMBU1-10 (1-10) nach Endonukleaseverdau mit *EcoRI* (siehe Tabelle 23, Transformation 1). X, Längenstandard 0,07-12,2 kbp. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Auch die Plasmide aus 3 Subklonen (Klon pMBU6-01 bis Klon pMBU6-03) der Transformation 6 (siehe Tabelle 22) wurden mit *EcoRI* verdaut und die Restriktionsfragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Die berechnete Länge des

Sialidase cDNA-Fragments beträgt 1162 bp (siehe Tabelle 23). Nach *EcoRI*-Verdau wurde das Fragment in den Plasmiden pMBU1-02 und pMBU1-10 nachgewiesen (nicht gezeigt).

Daß es sich bei den nachgewiesenen Fragmenten tatsächlich um Sialidase cDNA handelt, wurde durch die Bildung von definierten Spaltprodukten nach Verdau mit den entsprechenden Restriktions-Endonukleasen festgestellt.

Nach Endonukleaseverdau mit *Bam*HI, *Hind*III und *Sca*I wurden die definierten Fragmente in den Plasmiden pMBU1-02 und pMBU1-10 (Transformation 1) detektiert (siehe Abbildung 24, A, Tabelle 23).

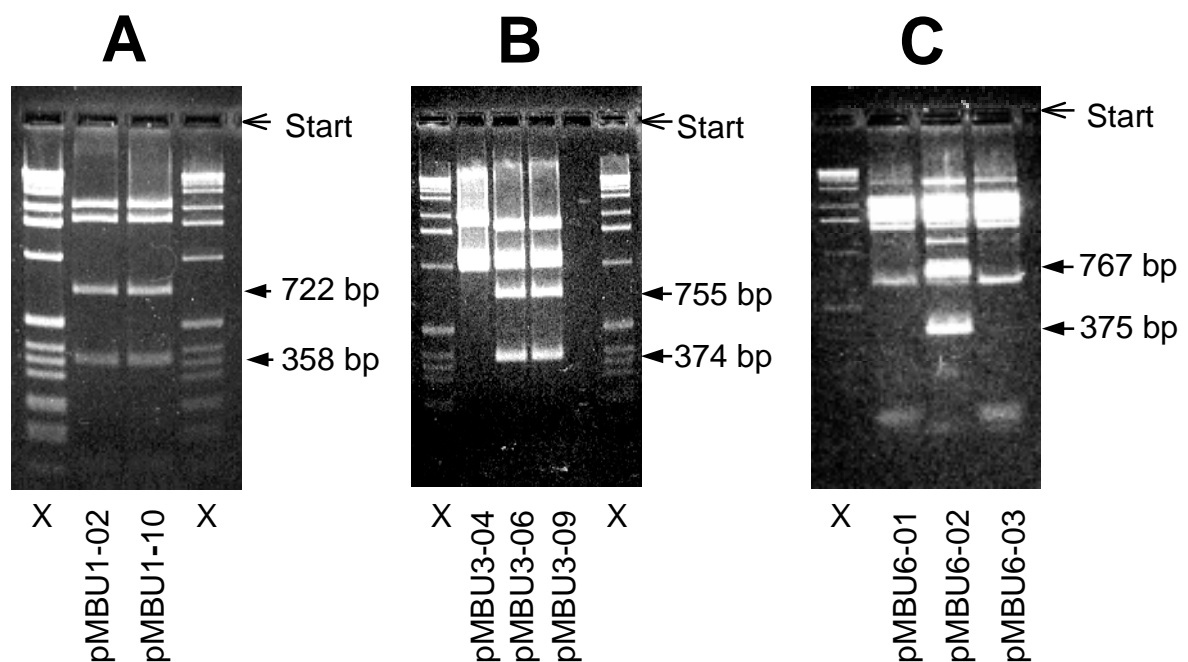


Abbildung 24: Agarosegelelektrophorese von Plasmiden aus den *E. coli* InoF⁺ Subklonen pMBU1-02 und pMBU1-10 nach Endonukleaseverdau mit *Bam*HI, *Hind*III und *Sca*I (A, Transformation 1 (siehe Tabelle 23)), den Subklonen pMBU3-04, pMBU3-06 und pMBU3-09, nach Endonukleaseverdau mit *Bgl*II und *Sca*I (B, Transformation 3 (siehe Tabelle 23)) und den Subklonen pMBU6-01, pMBU6-02 und pMBU6-03, nach Endonukleaseverdau mit *Bam*HI, *Eco*RI und *Sca*I (C, Transformation 3 (siehe Tabelle 23)). A, 722 bp und 358 bp Sialidase cDNA-Fragmente; B, 755 bp und 374 bp Sialidase cDNA-Fragmente; C, 767 bp und 375 bp Sialidase cDNA-Fragmente; X, Längenstandard 0,07-12,2 kbp. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Die Sialidase cDNA-Fragmente aus Plasmiden pMBU3-06 und pMBU3-09 (Transformation 3) wurden nach Endonukleaseverdau mit *Bgl*II und *Sca*I detektiert. Im Vergleich dazu sind in den Auftrennungen des Plasmids pMBU3-04, das als Negativkontrolle ebenfalls verdaut wurde, keine definierten Sialidase cDNA-Fragmente vorhanden (siehe Abbildung 24, B, Tabelle 23).

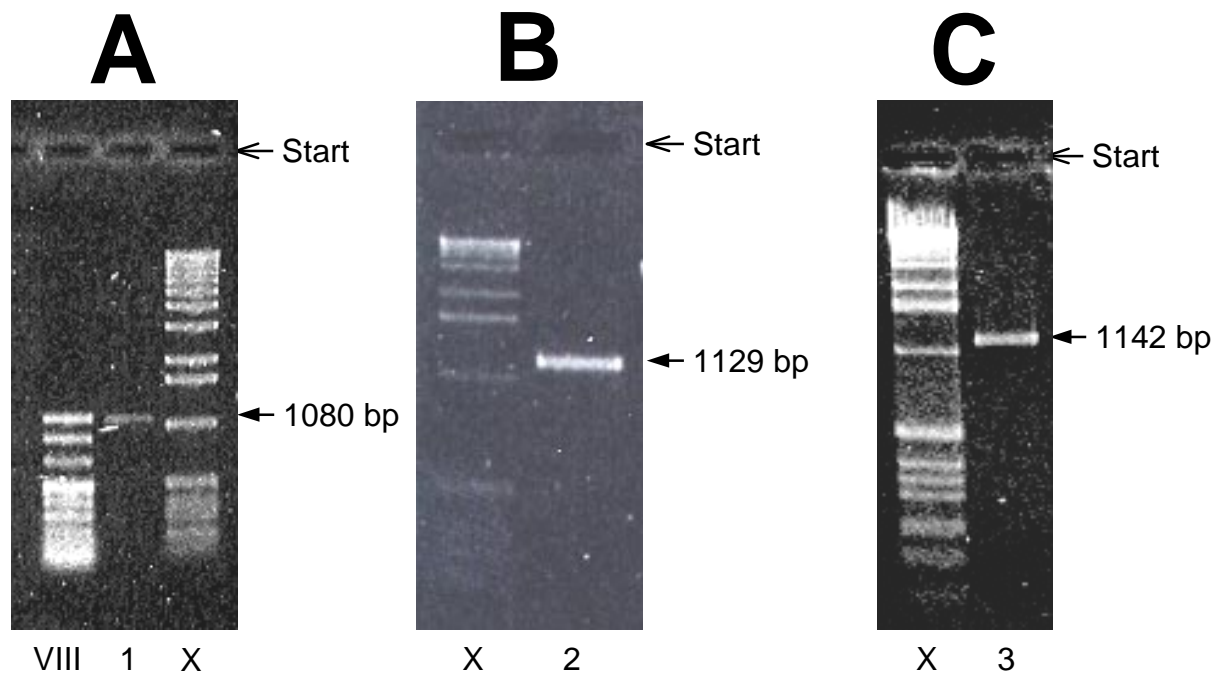


Abbildung 25: Agarosegelelektrophorese der Sialidase cDNA-Fragmente, isoliert aus den Plasmiden pMBU1-02 (A), pMBU3-09 (B) und pMBU6-02 (C). 1, 1080 bp *Bam*HI-*Hind*III-Sialidase cDNA; 2, 1129 bp *Bgl*II-*Bgl*II-Sialidase cDNA; 3, 1142 bp *Bam*HI-*Eco*RI-Sialidase cDNA; X, Längenstandard 0,07-12,2 kbp; VIII, Längenstandard 19-1114 bp. Die isolierte Sialidase cDNA wurde auf 1 % (A) und 2 % (B und C) Agarosegelen aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Auch im Plasmid pMBU6-02 (Transformation 6) konnten Sialidase cDNA-Fragmente nach Endonukleaseverdau mit *Bam*HI, *Eco*RI und *Sca*I nachgewiesen werden. In den Auftrennungen der Negativkontrollen pMBU6-01 und pMBU6-03 wurden dagegen keine Banden der entsprechenden Größe gefunden (siehe Abbildung 24, C, Tabelle 23).

Zur weiteren Klonierung wurden die Sialidase cDNA-Fragmente aus den Plasmiden pMBU1-02, pMBU3-09 und pMBU6-02 ausgeschnitten und wie unter Punkt 2.4.3.1 beschrieben isoliert. In Abbildung 25 sind die isolierten Sialidase cDNA-Fragmente in Agarosegelen dargestellt. Aus pMBU1-02 wurde ein *Bam*HI-*Hind*III Fragment für die Klonierung in den Expressionsvektor pQE31 isoliert (siehe Abbildung 25, A). Das *Bgl*II-*Bgl*II Fragment zur Klonierung in die Expressionsvektoren pQE16 und pQE61 wurde aus dem Plasmid pMBU3-09 isoliert (siehe Abbildung 25, B) und das *Bam*HI-*Eco*RI Fragment aus dem Plasmid pMBU6-02 (siehe Abbildung 25, C) wurde zur Klonierung in den pGEX-2T Expressionsvektor eingesetzt. Die Schnittstellen der Sialidase cDNA-Fragmente sind so gewählt, daß bei der Klonierung in die Expressionsvektoren weder das Leseraster der Sialidase noch das des Fusionspartners unterbrochen wird, so daß das gewünschte Fusionsprotein gebildet werden kann.

3.1.4 Klonierung der Sialidase cDNA-Fragmente in Expressionsvektoren

Aus den Plasmiden, die bei der Subklonierung der Sialidase cDNA in den pCR 2.1 Vektor gebildet wurden, wurden Sialidase cDNA-Fragmente zur Klonierung in die Expressionsvektoren pQE16, pQE60, pQE31 und pGEX-2T isoliert. Die Expressionsvektoren pQE16 und pQE60 kodieren für einen C-terminalen, der Expressionsvektor pQE31 für einen N-terminalen 6xHis-tag. Der Expressionsvektor pGEX-2T trägt die Sequenz für eine N-terminale Glutathion S-Transferase (GST). In dem in Abbildung 26 dargestellten Klonierungsschema sind die Plasmide der Subklone, die isolierten Sialidase cDNA-Fragmente und die aus der Klonierung der Sialidase cDNA mit den Expressionsvektoren zu erwartenden Plasmide zusammengefaßt. Zur Transformation wurden *E. coli* M15 pREP4 Zellen eingesetzt.

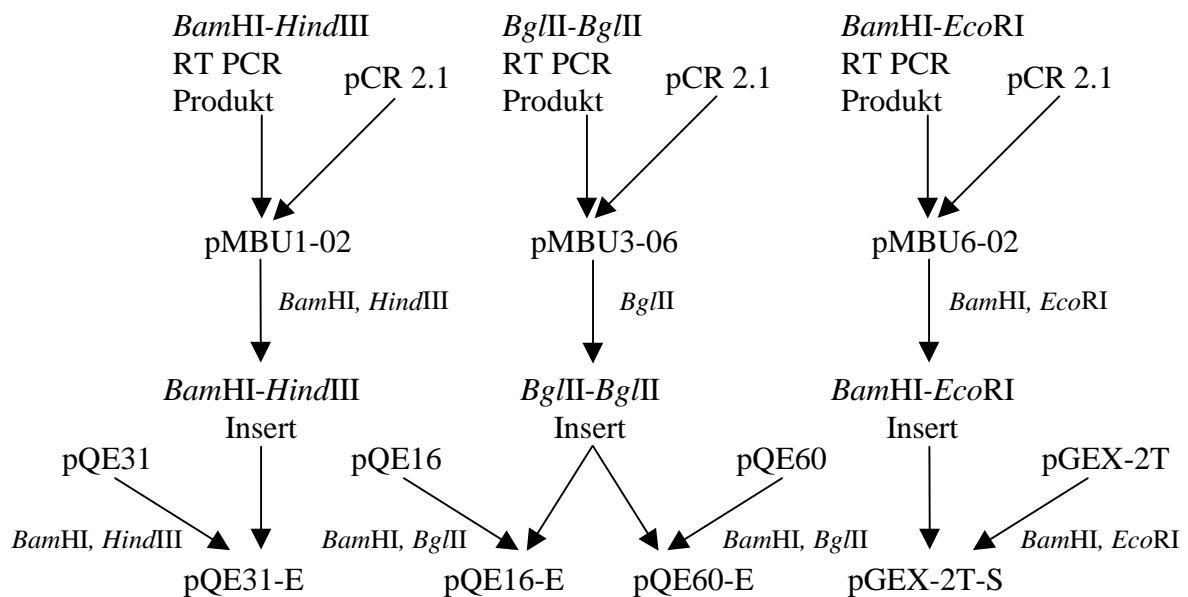


Abbildung 26: Zusammenfassung der Klonierungsschritte. Dargestellt ist die Subklonierung der Sialidase cDNA in pCR 2.1 Vektoren und die daraus resultierenden Plasmide, die isolierten Sialidase cDNA-Fragmente für die Klonierung in die Expressionsvektoren pQE16, pQE60, pQE31 und pGEX-2T und die zu erwartenden Plasmide mit Sialidase-Insert.

Tabelle 24: Bezeichnungen der Vektoren und Klone der Transformationen mit den Expressionsvektoren pQE16, pQE60, pQE312 und pGEX-2T mit Sialidase cDNA-Insert.

Expressionsvektor	pQE16	pQE60	pQE31	pGEX-2T
Insert (Sialidase cDNA)	BglII-BglII Fragment	BglII-BglII Fragment	BamHI-HindIII Fragment	BamHI-EcoRI Fragment
Vektor (Expressionsvektor + Insert)	pQE16-E	pQE60-E	pQE31-E	pGEX-2T-S
getestete Subklone	Klon pQE16-E-01 bis Klon pQE16-E-50	Klon pQE60-E-01 bis Klon pQE60-E-50	Klon pQE31-E-01 bis Klon pQE31-E-17	Klon pGEX-2T-S1 bis Klon pGEX-2T-S20
Subklon mit Insert	keine	keine	Klon pQE31-E-04 Klon pQE31-E-05 Klon pQE31-E-10 Klon pQE31-E-14 Klon pQE31-E-17	Klon pGEX-2T-S1 Klon pGEX-2T-S2 Klon pGEX-2T-S6 Klon pGEX-2T-S8 Klon pGEX-2T-S17 Klon pGEX-2T-S19
isoliertes Plasmid mit Insert	keine	keine	pQE31-E-04 pQE31-E-05 pQE31-E-10 pQE31-E-14 pQE31-E-17	pGEX-2T-S1 pGEX-2T-S2 pGEX-2T-S6 pGEX-2T-S8 pGEX-2T-S17 pGEX-2T-S19

Die Benennung der in den folgenden Klonierungsschritten gebildeten Klone und Plasmide ist in Tabelle 24 erläutert. In der Tabelle ist dargestellt, welche Sialidase cDNA-Fragmente in die verschiedenen Expressionsvektoren kloniert wurden, welche Klone getestet und welche Plasmide mit Sialidase cDNA-Insert identifiziert wurden.

3.1.4.1 Klonierung des *Bgl*II-*Bgl*II Fragments in die Expressionsvektoren pQE16 und pQE60

Zur Klonierung des *Bgl*II-*Bgl*II-Fragments in die Expressionsvektoren pQE16 und pQE60 wurden die Endonukleasen *Bam*HI und *Bgl*II verwendet. Diese Restriktionsenzyme bilden GATC-Überhänge, d.h. sie generieren gleiche Schnittstellen. Linearisierte Vektoren, die gleiche Schnittstellen an den Enden tragen, können religieren. Da Transformanden mit religierten Vektoren keinem Selektionsdruck unterliegen, ist zur Verringerung der Religationsrate eine Dephosphorylierung der mit *Bam*HI und *Bgl*II linearisierten Vektoren notwendig. Die *Bgl*II-Schnittstellen, die das Insert flankieren, ermöglichen eine Klonierung, bei der die Sialidasesequenz und der C-terminale 6xHis-tag im richtigen Leseraster vorliegen.

Nach der Ligation der *Bgl*II-*Bgl*II-Fragmente in die Vektoren pQE16 und pQE60 und der Transformation der kompetenten *E. coli* M15 pREP4 Zellen wurden die Klone aus den beiden Transformationen mit sterilen Zahnstochern auf frische Agarplatten überimpft und nummeriert. Jeweils 50 Klone (Klon pQE16-E-01 bis pQE16-E-50 und Klon pQE60-E-01 bis pQE60-E-50) wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein der Insertsequenz hin untersucht. Aus den Klonen, in denen die Sialidasesequenz nachgewiesen werden konnte, wurden die Plasmide isoliert, um die Sialidase cDNA mit Hilfe von Restriktionsanalysen nachzuweisen.

Im folgenden sind exemplarisch die Auftrennungen der PCR-Produkte einiger Klone dargestellt. Abbildung 27 zeigt die Auftrennung der Kolonie-PCR-Produkte der Klone pQE60-E-15 bis pQE60-E-27 nach der Transformation mit dem Ligationsprodukten aus pQE60 und dem *Bgl*II-*Bgl*II Fragment. Als Kontrolle wurde dabei der *E. coli* Inf α F⁺ Subklon pMBU3-09, der Sialidase cDNA enthält, eingesetzt. Die Kontrolle zeigt eine wesentlich intensivere Sialidase cDNA Bande als die Produkte der getesteten *E. coli* M15 pREP4 Klone. Aus den Klonen, in denen die Sialidasesequenz nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 27), wurden die Plasmide isoliert. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen wurde das Vorhandensein des Sialidase-Inserts bestätigt. In keinem der mittels Kolonie-PCR identifizierten Klone konnte das Sialidase cDNA-Insert nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

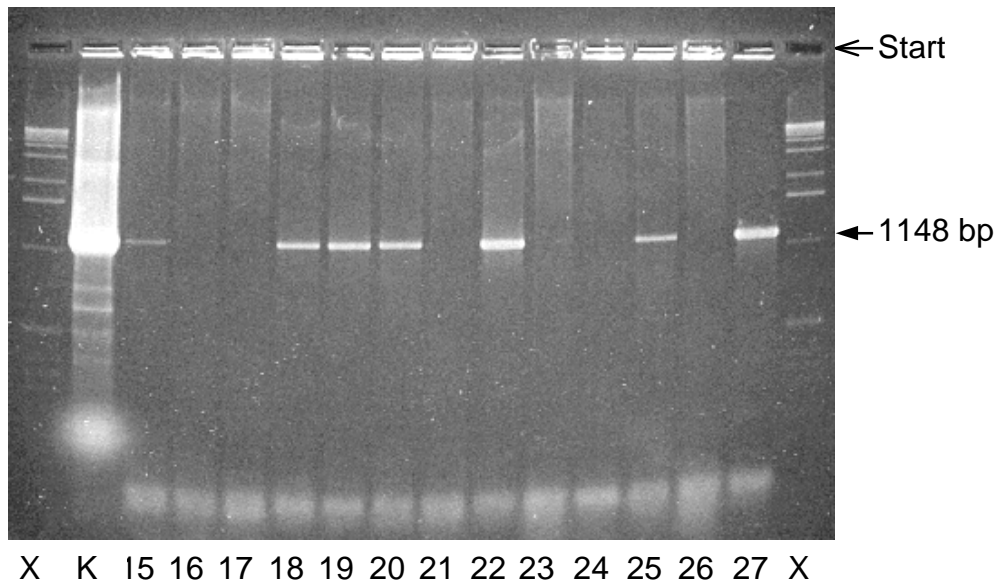


Abbildung 27: Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR-Produkte (1148 bp PCR-Produkt der Primer CHOSIAL 41 und CHOSIAL 42) aus den Klonen pQE60-E-15 bis pQE60-E-27 (15-27). K, Kolonie-PCR-Produkt des Subklons pMBU3-09; X, Längenstandard 0,07-12,2 kbp. Die PCR-Produkte wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Die schwachen Sialidase cDNA Banden (siehe Abbildung 27) sind vermutlich auf cDNA Moleküle aus dem Ligationsansatz zurückzuführen. Da es sich bei der PCR um eine sehr sensitive Methode handelt, wurden offenbar Sialidase cDNA-Moleküle, die bei der Überführung der Transformanten auf frische Agarplatten übertragen wurden, detektiert. Die Ligation mit gleichen Überhängen führte trotz Dephosphorylierung zu einer Vielzahl von religierten Vektoren und damit zu Transformanten, die kein Insert enthalten. Werden dagegen zwei Schnittstellen, die verschiedene Überhänge bilden, zur Ligation eingesetzt, sollte sich Anzahl an religierten Vektoren verringern und es sollten mehr Klone entstehen, die das Sialidase-Insert enthalten.

3.1.4.2 Klonierung des *Bam*HI-*Hind*III Fragments in den Expressionsvektor pQE31

Der pQE31 Vektor wurde mit *Bam*HI und *Hind*III vorverdaut, dephosphoryliert und dann mit dem *Bam*HI-*Hind*III Fragment ligiert. Die *Bam*HI Schnittstelle des Inserts wurde so gewählt, daß die Sialidasesequenz im Leseraster in den Vektor eingefügt werden kann. Das resultierende Protein verfügt sowohl über einen N-terminalen 6xHis-tag, als auch über die Amonisäuresequenz der Sialidase. Als Startcodon wird dabei das ATG-Triplett des Vektors verwendet.

Kompetente *E. coli* M15 pREP4 Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Da das *Bam*HI-*Hind*III-Insert mit Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Überhänge bilden, in den Expressionsvektor pQE31 kloniert wurde, ist davon auszugehen, daß die Anzahl der positiven Klone höher ist als bei der Verwendung von nur einer Schnittstelle. Deshalb wurde bei diesen Versuchen auf eine Kolonie-PCR verzichtet.

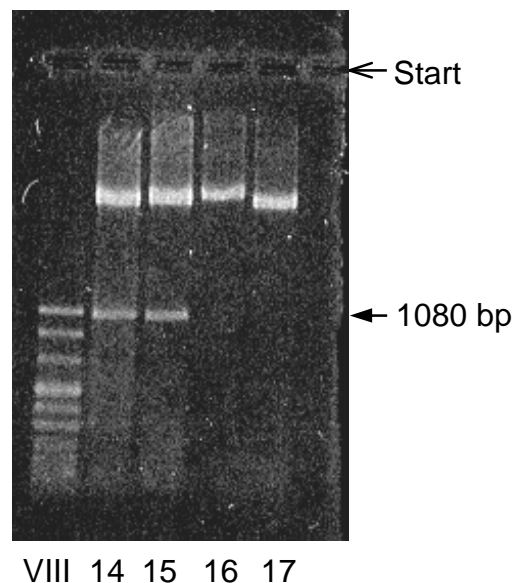


Abbildung 28: Agarosegelelektrophorese der Plasmide aus den Klonen pQE31-E-14 bis pQE31-E-17 (14-17) nach Endonukleaseverdau mit *Bam*HI und *Hind*III. 14 und 15, 1080 bp *Bam*HI-*Hind*III-Sialidase-Insert; VIII, Längenstandard 19-1114 bp. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

Aus insgesamt 17 Transformanden (Klon pQE31-E-01 bis pQE31-E-17) wurden die Plasmide isoliert und mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Die Restriktionsfragmente wurden auf 1 % Agarosegelen aufgetrennt und auf das Vorhandensein der Sialidase cDNA hin untersucht. Abbildung 28 zeigt das Agarosegel der Plasmide aus den Klonen pQE31-E-14 bis pQE31-E-17. Das Sialidase-Insert konnte in den Plasmiden pQE31-E-14 und pQE31-E-15 nachgewiesen werden. Die Plasmide pQE31-E-04, pQE31-E-05 und pQE31-E-10 enthielten ebenfalls das Sialidase cDNA-Insert (nicht gezeigt). In 5 von 17 untersuchten Transformanden konnte das 1080 bp Insert nachgewiesen werden.

3.1.4.3 Klonierung des *Bam*HI-*Eco*RI Fragments in den GST

Expressionsvektor pGEX-2T

Der Expressionsvektor pGEX-2T wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und dephosphoryliert. Die Insertion der Sialidase cDNA erfolgte, wie auch beim pQE31, im Leseraster, so daß sich das resultierende Protein aus der N-terminalen GST-Sequenz und der C-terminalen Sialidasesequenz zusammensetzt. Die Sialidase cDNA wurde mit dem Vektor ligiert und kompetente *E. coli* M15 pREP4 Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Plasmidisolierungen aus 20 Klonen wurden mit *Bam*HI, *Eco*RI und *Sca*I geschnitten und die Restriktionsansätze auf 2% Agarosegelen aufgetrennt.

In sechs von insgesamt 20 Plasmidisolierungen konnte das Insert nachgewiesen werden. Abbildung 29 zeigt exemplarisch den Nachweis des Inserts durch Restriktionanalyse in vier von den sechs Klonen, wobei Plasmidisolierungen der Klone pGEX-2T-S4 und pGEX-2T-S7 den religierten Vektor pGEX-2T enthalten. Das Insert konnte in den Plasmiden pGEX-2T-S1, pGEX-2T-S2, pGEX-2T-S6, pGEX-2T-S8, pGEX-2T-S17 und pGEX-2T-S19 eindeutig identifiziert werden.

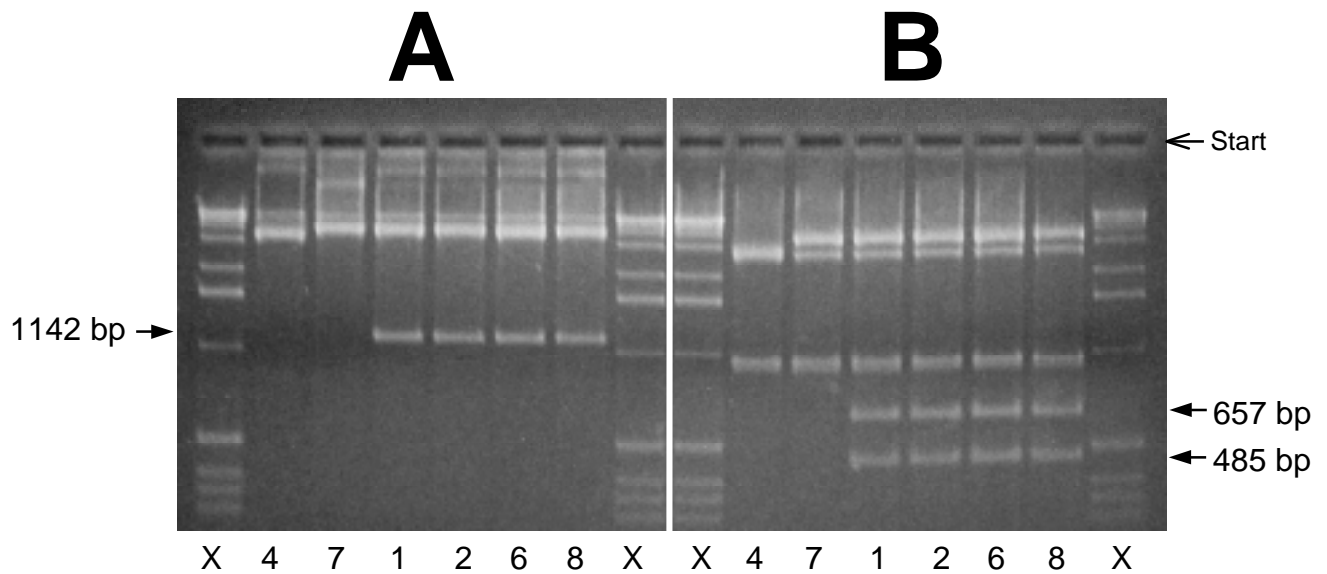


Abbildung 29: Agarosegelelektrophorese der Plasmide aus den Klonen pGEX-2T-S1 (1), pGEX-2T-S-2 (2), pGEX-2T-S4 (4), pGEX-2T-S6 (6), pGEX-2T-S7 (7) und pGEX-2T-S8 (8), nach Endonukleaseverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI (A) und *Bam*HI, *Eco*RI und *Pst*I (B). X, Längenstandard 0,07-12,2 kbp. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr gefärbt.

3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit dem RNeasy Total RNA Kit wurden reproduzierbare RNA Mengen aus CHO K1 isoliert, weshalb der Kit für alle weiteren RNA-Isolierungen eingesetzt wurde.

Aus CHO K1, CHO SS3 A2 und aus CHO HC II Klon 6 wurde RNA isoliert und für die RT PCR eingesetzt. Aus welcher der drei verschiedenen CHO-Zelllinien die RNA stammte, wurde hatte keinen Einfluß auf die gebildeten RT PCR-Produkte. Die Amplifikation der Sialidase cDNA wurde bei 63, 65, 68 und 70°C Annealingtemperatur getestet. Die Annealingtemperatur hatte nur einen sehr geringen Einfluß auf die Bildung der RT PCR-Produkte und die Bildung unspezifischer Fragmente. Es wurde unabhängig vom eingesetzten Primerpaar eine Annealingtemperatur von 68°C für die weiteren Versuche ausgewählt. Sowohl mit Ampli Taq Polymerase als auch mit Synergy

Polymerase konnte die Sialidase cDNA amplifiziert werden. Durch den Einsatz verschiedener Primerpaare wurden RT PCR-Produkte mit unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen (siehe Tabelle 21) amplifiziert.

Die, hinsichtlich ihrer Schnittstellen für die Klonierung, unterschiedlichen RT PCR-Produkte wurden in pCR 2.1 Vektoren subkloniert. Das RT PCR Produkt des Primerpaares CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12 konnte in den Plasmiden des Subklons pMBU1-02 und pMBU1-10, das Produkt des Primerpaares CHOSIAL 41 /CHOSIAL 42 in den Plasmiden des Subklons pMBU3-06 und pMBU3-09 und das Produkt des Primerpaares CHOSIAL 51 / CHOSIAL52 im Plasmid des Subklons pMBU9-02 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 26). Aus dem Plasmid pMBU1-02 wurde das *Bam*HI-*Hind*III Sialidase cDNA-Fragment zur Klonierung in den Expressionsvektor pQE31, aus pMBU3-09 das *Bgl*II-*Bgl*II-Fragment zur Klonierung in die Expressionsvektoren pQE16 und pQE60 und aus pMBU6-02 das *Bam*HI-*Eco*RI-Fragment zur Klonierung in den Expressionsvektor pGEX-2T isoliert.

Die isolierten Sialidase cDNA-Fragmente wurden in die Expressionsvektoren kloniert. Das *Bgl*II-*Bgl*II-Fragment wurde in die Expressionsvektoren pQE16 und pQE60 kloniert. Obwohl jeweils 50 Klone überprüft wurden, konnte das Sialidase-Insert in keinem der pQE16-E und pQE60-E Klone nachgewiesen werden.

Die Klonierung des *Bam*HI-*Hind*III-Fragments in den Expressionsvektor pQE31 war dagegen erfolgreich. In 5 von 17 Klonen konnte die Sialidase cDNA nachgewiesen werden. Die Plasmide pQE31-E-04, pQE31-E-05, pQE31-E-10, pQE31-E-14 und pQE31-E-15 enthielten das Sialidase-Insert.

Auch nach der Klonierung des *Bam*HI-*Eco*RI-Fragments in den Expressionsvektor pGEX-2T konnten aus 6 von 20 Klonen Plasmide mit Sialidase cDNA isoliert werden. Das Sialidase-Insert war in den Plasmiden pGEX-2T-S1, pGEX-2T-S2, pGEX-2T-S6, pGEX-2T-S8, pGEX-2T-S17 und pGEX-2T-S19 vorhanden.

3.2 Expression der rekombinanten cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen in *E. coli*

Die Expressionsvektoren pQE31 und pGEX-2T wurden ausgewählt, weil sie die genetische Information für unterschiedliche Fusionspartner tragen, die an die cytosolische CHO-Zell-Sialidase angehängt werden. Bei der Klonierung in den Expressionsvektor pQE31 wird die Sialidase cDNA mit der Sequenz eines 6xHis-tag gekoppelt. Das resultierende Fusionsprotein setzt sich aus einem N-terminalen Polyhistidinrest und der cytosolischen Sialidase zusammen. Im Falle des Expressionsvektors pGEX-2T wird die Sialidase nicht nur mit einem Peptid, sondern mit einem ganzen Protein gekoppelt. Die Sialidase cDNA wird so inseriert, daß die Sequenz für eine GST vorgeschaltet wird. Das daraus entstehende Sialidase-Fusionsprotein besitzt einen N-terminalen GST-Anteil. Die Klonierung des Sialidase cDNA-Inserts in die Expressionsvektoren pQE31 und pGEX-2T stellt nicht sicher, daß das Enzym auch mit seinen spezifischen biologischen Funktionen exprimiert wird. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen eine lösliche und aktive Sialidase gebildet wird.

Die Expressionsvektoren sind so konstruiert, daß sie in einer hohen Kopienzahl in den Zellen vorliegen. Sie besitzen einen regulierbaren Promotor, der auf eine hohe und IPTG-induzierbare Proteinexpression ausgerichtet ist [SMITH AND JOHNSON, 1988]. Die Zellen enthalten zusätzlich ein pREP4 Plasmid, das für einen Repressor codiert, der die Regulierbarkeit der Induktion mit IPTG verbessert und einer Überproduktion des rekombinanten Proteins entgegenwirkt. Exprimierte rekombinante Proteine sind häufig in Gesamtproteinextrakten von Transformanten leicht identifizierbar, da sie im Vergleich zu den zelleigenen Proteinen im Überschuß produziert werden. Die Expressionsanalyse anhand von Gesamtproteinextrakten gibt allerdings keinen Aufschuß darüber, ob das Protein in einer aktiven Form vorliegt oder nicht.

Hohe Proteinsyntheseleistungen der Zellen resultieren zwar in einer gewünschten Überproduktion des rekombinanten Proteins, können aber auch zur Bildung von Einschlußkörpern (inclusion bodies) führen. Eingriffe zur Vermeidung einer Überproduktion bestehen in der Verringerung der Induktionstemperatur, der IPTG-Konzentration oder der Induktionsdauer.

Durch die Herstellung bakterieller Lysate konnte mit Hilfe von Affinitätsbindungsstudien, SDS-PAGE, Immunoblot und Aktivitätsmessungen geklärt werden, welche Transformanten die cytosolische Sialidase aus CHO-Zellen exprimieren und unter welchen Kulturbedingungen ein lösliches und aktives Protein gebildet wird.

3.2.1 Expressionsanalyse mit den Klonen pQE31-E-04 und pQE31-E-10

Die Klone, in denen die Sialidase cDNA nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 24), sollten ein Protein exprimieren, das sich aus der Sialidasesequenz und einem N-terminalen Polyhistidinrest zusammensetzt. Das Molekulargewicht dieses Konstruktes sollte ca. 45 kDa betragen. Anhand der Klone pQE31-E-04 und pQE31-E-10 werden die Expressionsanalysen exemplarisch dargestellt.

Die Klone pQE31-E-04 und pQE31-E-10 wurden wie in Punkt 2.6.2.1 beschrieben kultiviert. Die Induktion erfolgte für 5,5 h mit 2 mM IPTG bei 37°C. Als Kontrolle diente jeweils eine Kultur des nicht-induzierten Klons. Die Gesamtproteinextrakte der Transformanten wurden wie unter Punkt 2.7.1 und 2.7.2 beschrieben hergestellt und untersucht.

In Abbildung 30 sind die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Gesamtproteinextrakte der induzierten und der nicht-induzierten Klone pQE31-E-04 und pQE31-E-10 dargestellt.

Die Extrakte wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel getrennt und die Proteinbanden mit Coomassie Blue gefärbt. Das erwartete Sialidase Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa konnte in den Gesamtproteinextrakten der Klone pQE31-E-04 und pQE31-E-10 nicht detektiert werden. Daraus läßt sich schließen, daß das Sialidase Fusionsprotein von den Klonen nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert wird oder daß das gebildete Fusionsprotein durch zelleigene Proteasen in *E. coli* proteolytisch verdaut wird.

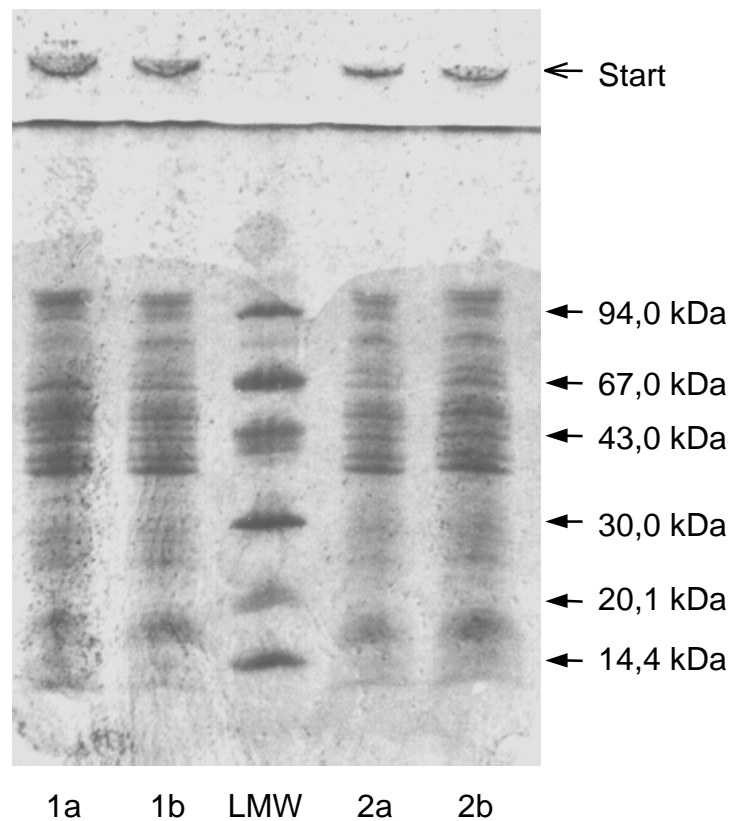


Abbildung 30: SDS-PAGE von Gesamtproteinextrakten der Klone pQE31-E-04 (1) und pQE31-E-10 (2) nach Induktion mit 2 mM IPTG (a) bei 37°C für 5 h 30 min. Als Kontrolle dienten die nicht-induzierten Klone (b); LMW, 14-94 kDa. Die Extrakte wurden in einem 8-25% SDS-Gradientengel aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt.

3.2.1.1 SDS-PAGE von Lysaten des Klons pQE31-E-04 nach Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung

Zum Nachweis von geringen Mengen des Sialidase Fusionsproteins wurden mit Ni-NTA Agarose affinitätsgereinigte Lysate des Klons pQE31-E-04 nach unterschiedlichen Induktionszeiten mittels SDS-PAGE untersucht. Der Klon pQE31-E-04 wurde wie unter Punkt 2.6.2.1 beschrieben, jedoch im zweifachen Kulturansatz, kultiviert. Induziert wurde mit 2 mM IPTG bei 37°C. Bei Induktionsstart und nach 2 und 3 h Induktion wurden jeweils 1,5 ml aus dem Kulturansatz entnommen. Die Lysate wurden wie unter Punkt 2.6.3.1 beschrieben hergestellt und mittels SDS-PAGE überprüft. Im Bereich von ca. 45 kDa konnte zwar eine Proteinbande detektiert

werden; diese ist aber ebenfalls in den Protein-Auftrennungen der nicht-induzierten Kontrolle vorhanden. Zusätzlich konnten sowohl im Bereich von ca. 30 kDa als auch bei ca. 15 kDa Proteinbanden gefunden werden, deren Intensität mit steigender Induktionsdauer zunimmt (siehe Abbildung 31).

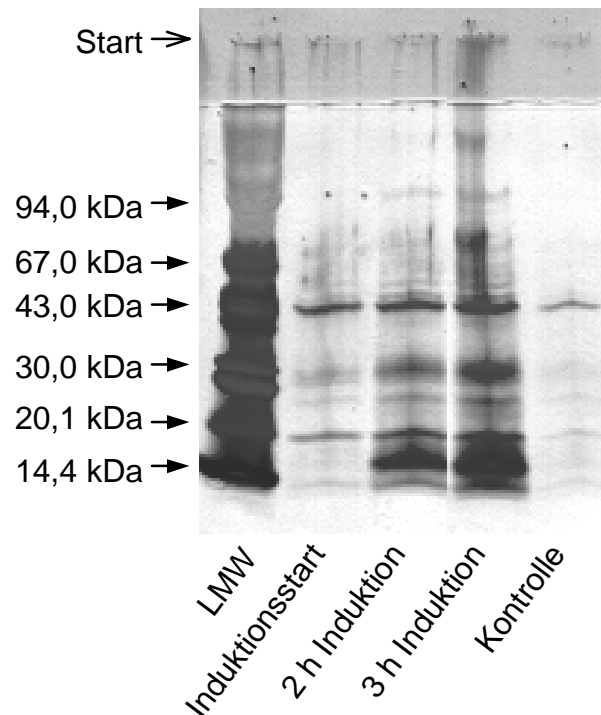


Abbildung 31: SDS-PAGE Ni-NTA-Agarose affinitätsgereinigter Proteine aus Lysaten des Klons pQE31-E-04 bei Induktionsstart und nach Induktion mit 2 mM IPTG bei 37°C für 2 und 3h. Als Kontrolle diente der nicht-induzierte Klon; LMW, 14-94 kDa. Die affinitätsgereinigten Proteine wurden in einem 8-25% SDS Gradientengel aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

In Lysaten des Klons pQE31-E-04 konnte auch nach der Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung das erwartete Sialidase Fusionsprotein nicht eindeutig nachgewiesen werden. Im SDS-Gel wurde zwar eine Proteinbande der entsprechenden Größe gefunden; diese Bande ist jedoch auch in der Kontrolle vorhanden. Das Vorhandensein dieser Bande kann entweder auf die unvollständige Repression des Promoters im Expressionsvektor zurückzuführen sein [WEICKERT et al., 1996], oder es handelt sich um ein zelleigenes Protein aus den zur Transformation eingesetzten *E. coli* M15 pREP4 Zellen. Die

zunehmende Intensität der zwei Proteinbanden bei ca. 15 und 30 kDa ist ein Hinweis auf die Expression unvollständig translatierter Fusionsproteine, die durch ihren N-terminalen Polyhistidin-Anteil mittels Ni-NTA Affinitätsaufreinigung aus dem Lysat isoliert werden können. Es könnte sich bei den detektierten Proteinen auch um die Produkte eines proteolytischen Verdaus des Sialidase Fusionsproteins durch zelleigene *E. coli* Proteasen handeln.

3.2.1.2 Bestimmung der Sialidaseaktivität in Lysaten der Klone pQE31-E-04 und pQE31-E-10

Aktivitätsmessungen wurden in den Lysaten der pQE31-E-04 und pQE31-E-10 durchgeführt. Bei der Expression eines aktiven Sialidase-Fusionsprotein sollte in den Lysaten eine meßbare Sialidaseaktivität vorhanden sein. Die Klone wurden mit 0,5 mM IPTG bei 27°C für 3 h induziert. Als Kontrolle wurde der Klon pQE31-E-17, der keine Sialidase cDNA enthält (siehe Abbildung 28), verwendet. Keines der Lysate zeigte eine signifikante Sialidaseaktivität gegenüber MUF-Neu5Ac.

Tabelle 25: Sialidaseaktivität der Lysate gemessen mit MUF-Neu5Ac.

<i>Lysate aus 1,5 ml Kulturvolumen</i>	<i>Aktivität ($\pm 0,011$) [$\mu\text{mol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$]</i>
Klon pQE31-E-17	0,001
Klon pQE31-E-04	0,005
Klon pQE31-E-10	0,001

In den Klonen pQE31-E-04 und pQE31-E-10, die den Expressionsvektor pQE31 mit der Sialidase cDNA enthalten, konnte kein Sialidase-Fusionsprotein exprimiert werden. Die Ergebnisse zeigten, daß von keinem der untersuchten Klone, ein aktives rekombinantes Sialidase-Fusionsprotein gebildet wurde.

3.2.2 Expressionsanalyse der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2

Die Klone, die Sialidase cDNA enthalten (siehe Tabelle 24), sollten nach der Induktion mit IPTG ein Fusionsprotein exprimieren, das sich aus der GST (26 kDa) und der

rekombinanten Sialidase (43 kDa) zusammensetzt. Das GST-Sialidase Fusionsprotein hat folglich ein theoretisches Molekulargewicht von 69 kDa. Anhand der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 werden die Expressionsanalysen exemplarisch dargestellt.

3.2.2.1 SDS-PAGE der Gesamtproteinextrakte aus den Klonen pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2

Gesamtproteinextrakte der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 wurden wie unter Punkt 2.7.1 hergestellt und mittels SDS-PAGE (siehe 2.7.2) aufgetrennt. Die Klone wurden mit 2 mM IPTG bei 37°C für 4 h induziert. Als Kontrolle wurde ein Gesamtproteinextrakt des Klons pGEX-2T-S7, der kein Sialidase cDNA-Insert enthält (siehe Abbildung 29), eingesetzt.

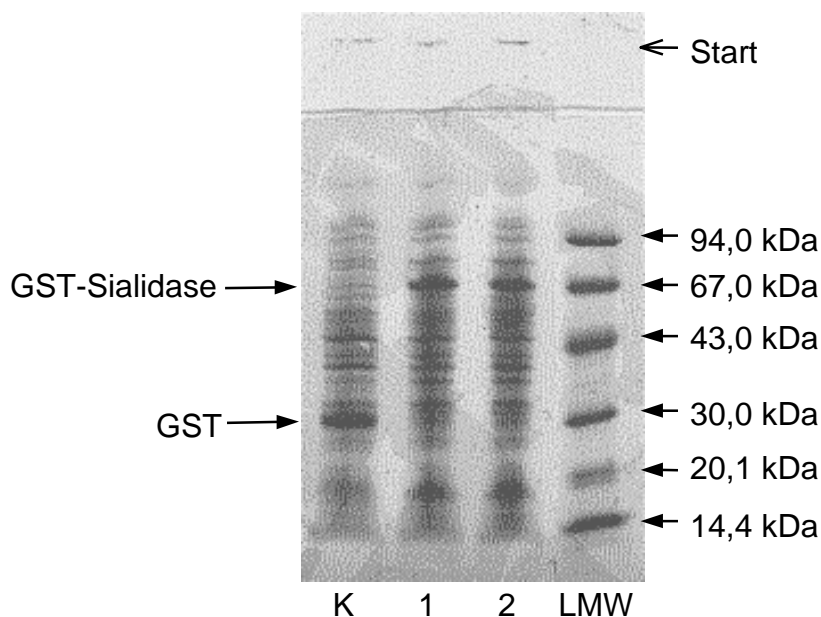


Abbildung 32: SDS-PAGE von Gesamtproteinextrakten der Klone pGEX-2T-S1 (1), pGEX-2T-S2 (2) und pGEX-2T-S7 (Kontrolle, K) nach Induktion mit 2 mM IPTG bei 37°C für 4 h; LMW, 14-94 kDa. Die Extrakte wurden in einem 8-25% SDS-Gradientengel aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt.

Abbildung 32 zeigt die in SDS-Gelen aufgetrennten Gesamtproteinextrakte der induzierten Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 sowie des Klons pGEX-2T-S7 (Kontrolle). In den Extrakten der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 ist deutlich die

GST-Sialidase Bande bei ca. 70 kDa zu sehen, die in der Kontrolle nicht vorhanden ist. Die Größe des exprimierten Proteins stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht des GST-Sialidase Fusionsproteins exakt überein. Der Kontroll-Klon pGEX-2T-S7 produzierte außer den zelleigenen Proteinen nur die GST mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Die Analyse der Gesamtproteine zeigt, daß die erfolgreich transformierten Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 nach der Induktion das erwartete GST-Sialidase Fusionsprotein exprimieren.

3.2.2.2 SDS-PAGE der Glutathion Sepharose 4B affinitätsgereinigten GST-Sialidase aus Lysaten der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2

Zum Nachweis der GST-Sialidase wurden Lysate der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 nach Glutathion Sepharose 4B Affinitätsaufreinigung mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es sollte festgestellt werden, ob die GST-Sialidase an die Glutathion Sepharose bindet und ob dabei zelleigene Proteine aus *E. coli* mit aufgereinigt werden. Dazu wurden Lysate aus 1-10 ml Kulturen der Klone hergestellt (siehe 2.6.2.1) und, nach Induktion mit 2 mM IPTG bei 37°C für 4 h, wie in Punkt 2.8.2 beschrieben aufgereinigt. Als Kontrollen wurden je eine Kultur des Klons pGEX-2T-S7 und eine nicht-induzierte Kultur des Klons pGEX-2T-S1 mitgeführt. Die affinitätsgereinigten Proteine wurden in 8-25 % SDS-Gradientengelen aufgetrennt und die Proteinbanden mit Silber angefärbt.

Abbildung 33 zeigt die affinitätsgereinigten Proteine aus Lysaten der Klone und pGEX-2T-S7 (Kontrolle) im SDS-Gel. In dem Gel erscheint nur die Bande der GST aus dem Kontroll-Klon pGEX-2T-S7 mit einem Molekulargewicht von 26 kDa (siehe Abbildung 33, K). In den Klonen pGEX-2T-S1, pGEX-2T-S2 wurden weder die GST noch die GST-Sialidase detektiert (siehe Abbildung 33, 1a, 1b und 2). Da die GST-Sialidase nicht mittels Glutathion Sepharose aufgereinigt werden konnte ist anzunehmen, daß das GST-Sialidase Fusionsprotein unter diesen Expressionsbedingungen in degenerierter Form, d.h. in Einschlußkörpern (inclusion bodies) vorliegt und daher nicht an die Affinitätsmatrix binden kann. Die Bildung von Einschlußkörpern kann durch die Veränderung der Induktionsparameter verringert oder ganz vermieden werden.

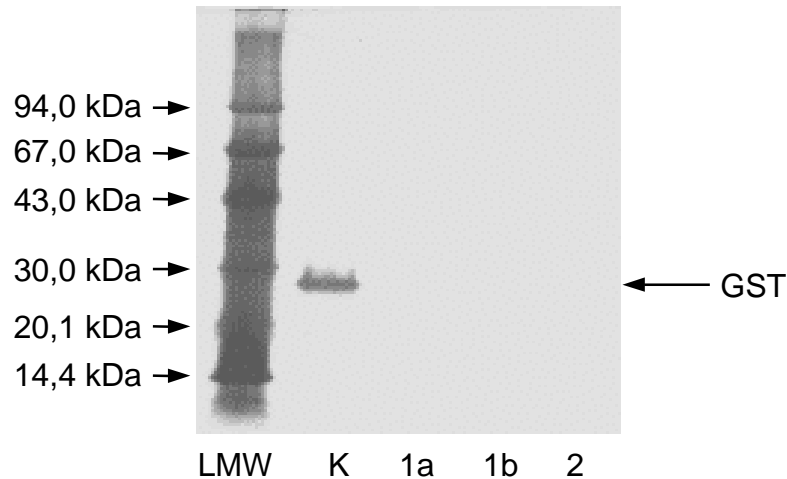


Abbildung 33: SDS-PAGE der Glutathion Sepharose 4B affinitätsgereinigten Proteine aus Lysaten der Klone pGEX-2T-S1 (1b), pGEX-2T-S2 (2) und pGEX-2T-S7 (Kontrolle, K), nach Induktion mit 2 mM IPTG bei 37°C für 4 h. Als Negativkontrolle diente das Lysat des nicht-induzierten Klons pGEX-2T-S1 (1a). LMW, 14-94 kDa. Die affinitätsgereinigten Proteine wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

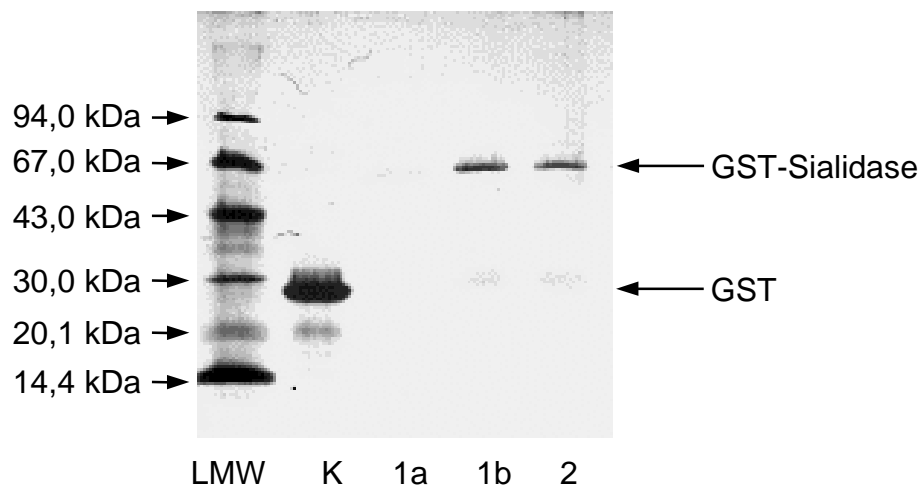


Abbildung 34: SDS-PAGE der Glutathion Sepharose 4B affinitätsgereinigten Proteine aus Lysaten der Klone pGEX-2T-S1 (1b), pGEX-2T-S2 (2) und pGEX-2T-S7 (Kontrolle, K) nach Induktion mit 0,05 mM IPTG bei 25°C für 2 h 30 min. Als Negativkontrolle diente das Lysat des nicht-induzierten Klons pGEX-2T-S1. LMW, 14-94 kDa. Die affinitätsgereinigten Proteine wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und mit Silber gefärbt

Aus diesem Grund wurde die Affinitätsaufreinigung der GST-Sialidase aus Lysaten der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 nach Induktion mit 0,05 mM IPTG bei 25°C für 2 h 30 min wiederholt.

Die affinitätsgereinigten Proteine, die bei Induktion mit geringerer IPTG-Konzentration, verringerter Temperatur und verkürzter Induktionsdauer von den Klonen gebildet wurden, konnten im SDS-Gel nachgewiesen werden (siehe Abbildung 34). Wie auch in Abbildung 33 erscheint die GST aus dem Kontroll-Klon pGEX-2T-S7 bei 26 kDa im Gel (siehe Abbildung 34, K). Nach der Veränderung der Induktionsbedingungen konnte in den Klonen pGEX-2T-S1 (siehe Abbildung 34, 1b) und pGEX-2T-S2 (siehe Abbildung 34, 2) die GST-Sialidase mit einem Molekulargewicht von 69 kDa detektiert werden. Daraus läßt sich schließen, daß die Klone unter den veränderten Induktionsbedingungen eine lösliche GST-Sialidase exprimieren. Im Gel ist bei den induzierten Klonen pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 noch eine schwache Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa sichtbar. Dabei kann es sich nicht um ein zelleigenes *E. coli* Protein handeln, da in dem nicht-induzierten Klon (siehe Abbildung 34, 1a) keine solche Bande vorhanden ist. Es handelt sich bei dieser Bande vermutlich um unvollständig translatierte GST-Sialidase.

3.2.2.3 Bestimmung der Sialidaseaktivität in Lysaten der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2

Die Aktivitätsmessung von Lysaten der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 gab Aufschluß darüber, ob das lösliche GST-Sialidase Fusionsprotein Sialidaseaktivität besitzt. Als Kontrollen dienten nicht transformierte *E. coli* M15 pREP4 Zellen. Die Repression des Promotors wurde mit Lysat aus dem nicht-induzierten Klon pGEX-2T-S1 überprüft. Die Zellen wurden in 1-10 ml Ansätzen kultiviert und mit 1 mM IPTG bei 25°C für 3h induziert. Die Lysate wurden wie unter Punkt 2.6.3.1 beschrieben hergestellt.

Tabelle 26: Sialidaseaktivität der Lysate gemessen mit MUF-Neu5Ac.

<i>Lysate aus 1,5 ml Kulturvolumen</i>	<i>Aktivität [$\mu\text{mol} / \text{ml} \times \text{h}$] ($\pm 0,107$)</i>	<i>Gesamtaktivität U [$\mu\text{mol} / \text{min}$] ($\pm 0,002$)</i>
<i>E. coli</i> M15 pREP4	0,000	0,001
Klon pGEX-2T-S1 (ohne IPTG)	0,412	0,006
Klon pGEX-2T-S1	0,804	0,013
Klon pGEX-2T-S2	0,719	0,012

Im Lysat aus *E. coli* M15 pREP4 konnte keine signifikante Aktivität gemessen werden. Dagegen zeigten die Lysate der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 eine deutliche Sialidaseaktivität gegenüber MUF-Neu5Ac. Da es sich um Klone aus derselben Transformation handelt, sind die Aktivitätsunterschiede gering. Auch im Lysat des nicht-induzierten Klons konnte Sialidaseaktivität nachgewiesen werden. Anteilig beträgt die gemessene Sialidaseaktivität im Lysat des nicht induzierten Klons ca. 50 % der Aktivität, die in den Lysaten der Klone nach Induktion mit IPTG gemessen wurde. Ein beträchtlicher Anteil der Sialidase kann also auch ohne IPTG-Induktion exprimiert werden. Trotz des zusätzlichen pREP4 Plasmids in den Klonen, welches ebenfalls über ein *lacI^q* verfügt und zusätzlich zum *lacI^q* im Expressionsvektor das Repressorprotein produziert, wird die Expression nicht vollständig unterbunden. Die unvollständige Repression des Promotors bei der Expression induzierbarer Proteine wurde bereits von WEICKERT et al. (1996) beschrieben.

3.2.3 Zusammenfassung der Expressionsanalysen

Die Klone, die den pQE31 Vektor mit dem Sialidase-Insert enthalten, produzierten kein aktives, lösliches Protein. Weder in den Gesamtproteinextrakten noch in affinitätsgereinigten Proben konnte ein neues Expressionsprodukt nachgewiesen werden. In den affinitätsgereinigten Proben konnte zwar ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa detektiert werden; diese Bande war jedoch ebenfalls in dem nicht-induzierten Klon vorhanden. Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich dabei um ein Sialidase-Fusionsprotein handelt. In den Lysaten der Klone pQE31-E-04 und pQE31-E-10 konnte keine Sialidaseaktivität nachgewiesen werden.

Die Expression der GST-Sialidase konnte in Gesamtproteinextrakten der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2, die den Expressionsvektor pGEX-2T mit dem Sialidase-Insert enthalten, nachgewiesen werden. Nachdem das GST-Sialidase Fusionsprotein zunächst mittels Glutathion Sepharose Affinitätsreinigung nicht aus den induzierten Klonen isoliert werden konnte, wurden die Induktionsbedingungen geändert. Nach der Induktion der Klone bei verringerter IPTG-Menge, einer niedrigeren Induktionstemperatur und einer verkürzten Induktionsdauer konnte die GST-Sialidase mit Glutathion Sepharose aus den Klonen isoliert werden. In den Lysaten der Klone wurde die Aktivität der GST-Sialidase nachgewiesen. Auch das Lysat des nicht-induzierten Klons zeigte Sialidaseaktivität, was auf eine unvollständige Repression des Promotors zurückzuführen ist. In den Klonen pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2 konnte ein lösliches und aktives GST-Sialidase Fusionsprotein exprimiert werden. Der Klon pGEX-2T-S1 wurde zur Herstellung der GST-Sialidase ausgewählt, da in den Lysaten dieses Klons eine höhere Sialidaseaktivität gemessen wurde als in den Lysaten des Klons pGEX-2T-S2.

3.3 Optimierung der Induktionsparameter zur Produktion der löslichen, aktiven GST-Sialidase mit dem Klon pGEX-2T-S1

Die Induktionsparameter, wie Induktionsdauer, IPTG-Konzentration, Induktionstemperatur und die jeweilige Wachstumsphase bei Induktionsstart, können die Produktion des rekombinanten Proteins beeinflussen. Der Anteil an aktivem, rekombinanten Enzym und die Gesamtmenge des Proteins können durch Variation der Parameter verändert werden [HEAPE et al., 1999]. Daher wurden in 250 ml Schüttelkolbenansätzen des Klons pGEX-2T-S1 verschiedene Induktionsparameter variiert und anschließend die GST-Expression überprüft. Zunächst wurde bei zwei verschiedenen Induktionstemperaturen (25°C und 37°C) induziert. Dann wurde der Einfluß unterschiedlicher Induktionszeiten (1, 2, 3 und 4 h) auf die Expression der GST-Sialidase überprüft. Drei parallele Ansätze wurden mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1 mM IPTG) und drei weitere Parallelansätze bei verschiedenen Zelldichten (OD_{600} 0,4, 0,68 und 1,05) induziert.

3.3.1 Einfluß der Induktionstemperatur auf die Expression

Die Induktionstemperatur kann die Produktion von löslichen und aktiven rekombinanten Proteinen, die in *E. coli* exprimiert werden, maßgeblich beeinflussen. Eine erniedrigte Induktionstemperatur fördert häufig die korrekte Faltung der Produkte. Eine Reihe verschiedener Faktoren, wie eine verminderte Proteinsyntheserate, die Veränderung der kinetischen Parameter für die Faltung der Polypeptidkette oder eine verringerte Tendenz zur Aggregatbildung, sind verantwortlich für die Ausbildung des nativen Zustands eines Proteins bei verringerter Induktionstemperatur [GEORGIOU AND VALAX, 1996].

Der Klon pGEX-2T-S1 wurde in zwei parallelen 250 ml Schüttelkolbenansätzen wie unter Punkt 2.6.2.2 beschrieben kultiviert. Nach 3 h Induktion der Zellen bei 25°C und bei 37°C mit 1 mM IPTG bei einer OD_{600} von 0,6 wurden die Lysate wie unter Punkt 2.6.3.2 beschrieben hergestellt und die Sialidaseaktivität gegenüber MUF-Neu5Ac gemessen.

Tabelle 27: Sialidaseaktivität von Lysaten des Klons pGEX-2T-S1 bei verschiedenen Induktionstemperaturen.

<i>Induktionstemperatur</i>	<i>Aktivität</i> <i>[nmol / ml x h]</i>	<i>Gesamtaktivität</i> <i>U [μmol / min]</i>
37°C	131,28 (± 4,56)	0,026 (± 0,001)
25°C	1957,81 (± 53,61)	0,392 (± 0,011)

Bei 25°C war die Sialidaseaktivität der Lysate um den Faktor 15 höher als bei 37°C Induktionstemperatur. Durch die Erniedrigung der Induktionstemperatur wurde die Expression von löslicher, aktiver GST-Sialidase deutlich gesteigert.

3.3.2 Einfluß der Induktionsdauer auf die Expression

Da rekombinante Proteine während der Produktion in *E. coli* bakteriellen Proteasen ausgesetzt sind [HENGEN, 1996], kann eine lange Induktionsdauer zu einem enzymatischen Verdau des Produkts und damit zu einem Anstieg an inaktivem Protein führen, da die gebildeten Proteine in den *E. coli* Zellen akkumuliert und nicht, wie bei der Produktion in tierischen Zellen, sekretiert werden. Vom Hersteller wurde für das GST Gene Fusion System eine Induktionsdauer von 2-6 h empfohlen.

Um festzustellen, ob ein enzymatischer Verdau der GST-Sialidase in den *E. coli* Zellen stattfindet, wurden 250 ml Schüttelkolbenansätze des Klons pGEX-2T-S1 mit 0,05 mM IPTG bei 25°C und einer OD₆₀₀ von 0,6 induziert, und nach 1, 2, 3 und 4 h Induktion wurde je 1,5 ml Zellsuspension entnommen. Die Zellen wurden lysiert, die festen Zellbestandteile abzentrifugiert (siehe 2.7.1) und die GST-Sialidase mit Glutathion Sepharose 4B (siehe 2.7.2.1) isoliert. Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und die Proteinbanden mit Silber angefärbt (Abbildung 35). Bei einer Induktionsdauer von nur einer Stunde wurde bereits eine intensive GST-Sialidasebande nachgewiesen. Eine Verlängerung der Induktionsdauer von 1 auf 2 h führte zu einer Erhöhung der GST-Sialidase-Konzentration. Eine weitere Zunahme der GST-Sialidase-Konzentration bei einer Verlängerung von 2 auf 4 h konnte anhand des Gels nicht detektiert werden. Das Fusionsproteins befindet sich in einer intensiven Bande bei ca. 70 kDa, so daß davon

auszugehen ist, daß bei Induktionszeiten bis zu 4 h das exprimierte Produkt nur in sehr geringem Maße degradiert wird. Allerdings erscheint im Induktionsverlauf bei ca. 30 kDa eine schwache, diffuse Proteinbande. Ein Vergleich mit Abbildung 34 zeigt, daß es sich dabei nicht um ein zelleigenes Protein aus *E. coli* handeln kann, da im nicht-

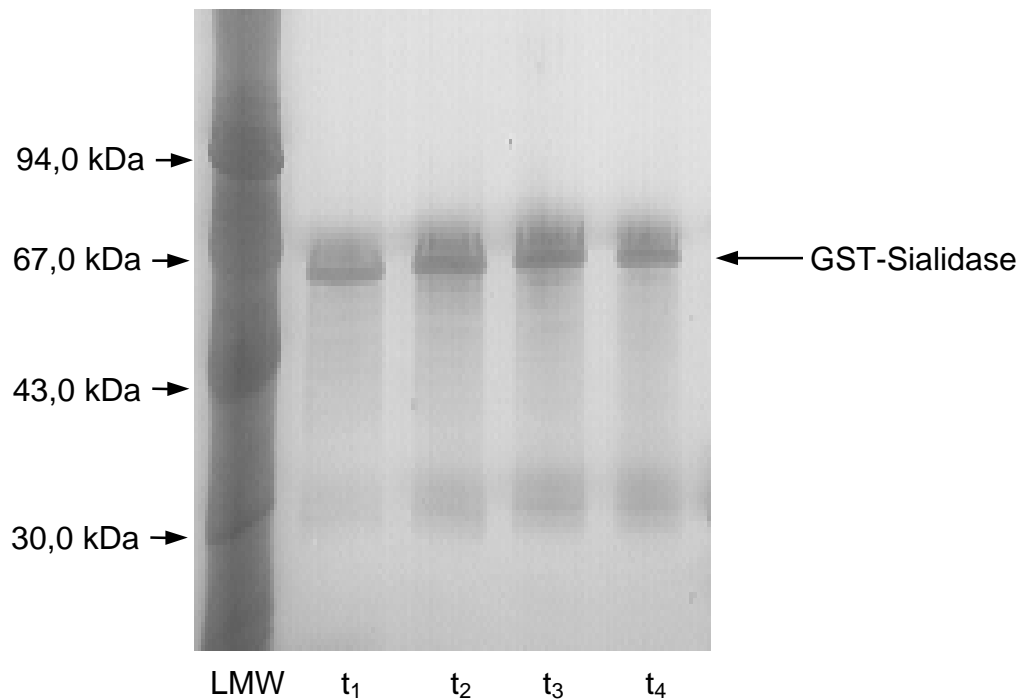


Abbildung 35: SDS-PAGE von affinitätsaufgereinigter GST-Sialidase aus Lysaten des Klons pGEX-2T-S1 nach Induktion mit 0,05 mM IPTG bei 25°C für 1 (t₁), 2(t₂), 3 (t₃) und 4 h (t₄). LMW, 14-94 kDa. Die Proteinbanden wurden auf 8-25 % SDS-Gradientengelen aufgetrennt und mit Silber angefärbt.

induzierten Klon diese Bande nicht vorhanden war. Daher muß angenommen werden, daß es sich bei diesem Protein entweder um ein proteolytisches Abbauprodukt der GST-Sialidase oder um ein unvollständig translatiertes GST-Sialidase Fusionsprotein handelt.

3.3.3 Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen

Nicht nur die Induktionsdauer kann die Proteinexpression beeinflussen sondern auch die Konzentration des Induktors [YANG et al., 1997]. Während höhere IPTG-Konzentrationen die Produktion steigern können [SHIN et al., 1997], bewirkt eine geringere IPTG Konzentration zwar eine verringerte Produktion, beugt aber der Bildung

von Einschlußkörpern vor. Drei 250 ml Schüttelkolbenansätze des Klon pGEX-2T-S1 wurden parallel angezogen und mit 0,1, 0,5 und 1mM IPTG bei 25°C und einer OD₆₀₀ von 1,0 für 2 h induziert. Nach Zellysis wurde die GST-Sialidase säulenchromatographisch mit Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt (siehe 2.8.2.2). Die Proteingehalte und die Sialidaseaktivitäten der Lysate sind in Tabelle 28 und der gereinigten GST-Sialidase in Tabelle 29 zusammengefaßt.

Tabelle 28: Sialidaseaktivitäten und Proteingehalte der Lysate aus Klon pGEX-2T-S1 nach Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen.

<i>IPTG-Konzentration</i>	<i>Sialidaseaktivität U [μmol / min] (± 0,011)</i>	<i>Gesamtprotein [mg] (± 0,77)</i>	<i>spezifische Aktivität [U / mg Protein] (± 0,001)</i>
0,1 mM	0,285	35,57	0,008
0,5 mM	0,333	31,00	0,011
1,0 mM	0,408	30,28	0,013

Tabelle 29: Aktivitäten und Proteingehalte der affinitätsgereinigten GST-Sialidase aus Klon pGEX-2T-S1 nach Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen.

<i>IPTG-Konzentration</i>	<i>Sialidaseaktivität U [μmol / min] (± 0,004)</i>	<i>Gesamtprotein [mg] (± 0,006)</i>	<i>spezifische Aktivität [U / mg Protein]</i>
0,1 mM	0,100	0,157	0,636 (± 0,111)
0,5 mM	0,111	0,206	0,541 (± 0,065)
1,0 mM	0,155	0,267	0,581 (± 0,039)

Es wurde nach Induktion der Zellen mit 1,0 mM IPTG eine höhere GST-Sialidase-Aktivität gemessen als nach Induktion mit niedrigeren IPTG-Konzentrationen. Bei Einsatz von 0,5 mM IPTG wurden 82 % und bei 0,1 mM IPTG 70 % der bei 1mM IPTG gemessenen maximalen Sialidaseaktivität erreicht (siehe Tabelle 28). Durch den Einsatz höherer IPTG-Konzentrationen wurde die Gesamtausbeute an aktiver GST-Sialidase gesteigert. Zwischen den spezifischen Aktivitäten der Isolate wurden unter

Berücksichtigung der erhaltenen Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt (siehe Tabelle 29). Im Durchschnitt wurden 35 % der GST-Sialidase, die in den Lysaten vorhanden war, mittels Glutathion Sepharose Affinitätschromatographie isoliert. Dabei konnte die spezifische Aktivität der GST-Sialidase im Mittel um das 58 fache angereichert werden.

3.3.4 Induktion bei verschiedenen Zelldichten

Die Induktion in verschiedenen Wachstumsphasen kann die Bildung von Einschlußkörpern beeinflussen. Drei 250 ml Parallelkulturen des Klon pGEX-2T-S1 in Schüttelkolben wurden bei optischen Dichten (OD_{600}) von 0,4, 0,68 und 1,05 mit 0,5 mM IPTG bei 25°C für 2 h induziert. Die Sialidaseaktivitäten der Lysate sind in Tabelle 30 und der affinitätsgereinigten GST-Sialidase in Tabelle 31 zusammengefaßt.

Tabelle 30: Sialidaseaktivitäten der Lysate aus Klon pGEX-2T-S1 nach Induktion bei verschiedenen Zelldichten.

<i>optische Dichte</i> <i>[OD_{600}]</i>	<i>Aktivität</i> <i>$U [\mu\text{mol} / \text{min}] (\pm 0,045)$</i>
0,40	0,120
0,68	0,123
1,05	0,104

Tabelle 31: Aktivitäten der affinitätsgereinigten GST-Sialidase aus Klon pGEX-2T-S1 nach Induktion bei verschiedenen Zelldichten.

<i>optische Dichte</i> <i>[OD_{600}]</i>	<i>Aktivität</i> <i>$U [\mu\text{mol} / \text{min}] (\pm 0,045)$</i>
0,40	0,080
0,68	0,115
1,05	0,083

Sowohl in den Lysaten als auch in den Isolaten wurden nach Inuktion bei einer optischen Dichte von 0,68 die höchsten Aktivitäten gemessen. Die Unterschiede

bewegen sich jedoch im angegebenen Fehlermeßbereich. Die Induktionen bei verschiedenen Zelldichten ergaben keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der GST-Sialidase Aktivität. Im Durchschnitt konnte nach der Aufreinigung noch 77 % der GST-Sialidaseaktivität der Lysate nachgewiesen werden; der Aufreinigungsverlust lag damit im Mittel bei 33 %.

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Senkung der Induktionstemperatur von 37°C auf 25°C bewirkt eine 15 fache Steigerung der Sialidaseaktivität in den Lysaten des Klons pGEX-2T-S1. Nach Induktion bei 37°C wurde nur ca. 7 % der Sialidaseaktivität des Lysates nach Induktion bei 25°C gemessen. Für alle folgenden Induktionen wurde eine Temperatur von 25°C gewählt und in allen weiteren Versuchen beibehalten.

Wie aus Abbildung 35 ersichtlich, wurde nach Induktion eines Schüttelkolbenansatzes des Klons pGEX-2T-S1 die GST-Sialidase bei einer Induktionsdauer von nur einer Stunde im Gel nachgewiesen. Nach 2 h Induktionszeit erschien eine intensivere GST-Sialidasebande im Gel. Die Verlängerung der Induktionsdauer von 2 auf 4 h bewirkte keine weitere Veränderung der GST-Sialidasebande. Mit steigender Induktionsdauer wurde im Gel eine schwache, diffuse Proteinbande bei ca. 30 kDa detektiert. Da diese Bande in Isolaten aus dem nicht-induzierten Klon nicht vorhanden ist, handelt es sich entweder um unvollständig gebildete GST-Sialidase oder um Proteolyseprodukte, die bei einem möglichen Verdau des intrazellulär akkumulierten Fusionsproteins in *E. coli* entstehen. Daher wurde in den weiteren Versuchen nicht länger als vier Stunden induziert.

Die Induktion von 250 ml Kolbenkulturen des Klons pGEX-2T-S1 mit 1 mM IPTG führt, im Vergleich zum Einsatz von 0,1 und 0,5 mM IPTG, zu einer höheren Sialidaseaktivität in den Lysaten. Bei Einsatz von 0,5 mM IPTG wurden 82 % und bei 0,1 mM IPTG 70 % der bei 1 mM IPTG gemessenen maximalen Sialidaseaktivität erreicht. Die affinitätschromatographische Aufreinigung der GST-Sialidase führte zu einer durchschnittlichen Ausbeute von 35 % und einer mittleren Anreicherung der Sialidaseaktivität um das 58 fache.

Die Gesamtaktivität im Lysat war nach Induktion des Klons pGEX-2T-S1 in 250 ml Schüttelkolben bei einer optischen Dichte von 0,68, in geringem Maße erhöht. Nach

Induktion bei einer OD_{600} von 0,4 und bei einer OD_{600} von 1,05 wurden jeweils 97 % und 85 % der maximalen Sialidaseaktivität erreicht. Die Induktionen bei den genannten Zelldichten ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sialidaseaktivitäten der Isolate.

Von den untersuchten Induktionsparametern bewirkte nur die Erniedrigung der Induktionstemperatur eine Erhöhung der Ausbeute an löslicher, aktiver GST-Sialidase.

3.4 Kultivierung des Klons pGEX-2T-S1 im 250 ml und im 25 Liter Maßstab

Die Kultivierungen des Klons pGEX-2T-S1 wurden in 250 ml Schüttelkolbenansätzen und in 25 Liter Ansätzen im Bioreaktor durchgeführt. Vier parallele Kultivierungen im 250 ml Maßstab und zwei Fermentationen im 25 Litermaßstab wurden durchgeführt und ihre Wachstumsverläufe aufgenommen. Im folgenden werden die Wachstumsverläufe der Kultivierungen in Schüttelkolben und im Bioreaktor beschrieben und miteinander verglichen.

3.4.1 Wachstumskurven aus parallelen Schüttelkolbenansätzen des Klons pGEX-2T-S1 im 250 ml Kulturmaßstab

Auf der Basis der Daten, die in den Versuchen zur Optimierung der Induktionsparameter gewonnen wurden, wurde der Klon pGEX-2T-S1 in vier parallelen 250 ml Schüttelkolbenansätzen kultiviert. Die Schüttelkolbenansätze wurden zunächst für 70 min vorkultiviert und dann mit 0,5 mM IPTG bei 25°C und einer OD_{600} zwischen 0,90 und 0,95 für 150 min induziert. Die Wachstumskurven aus vier Parallelansätzen vor und nach der Induktion wurden aufgenommen und sind in Abbildung 36 dargestellt. Die Zunahme der optischen Dichte im Kultivierungsverlauf war in den Parallelansätzen nahezu identisch. Da die Temperatur zum Zeitpunkt der Induktion von 37°C auf 25°C herabgesetzt wurde, verringerte sich zunächst die Wachstumsgeschwindigkeit nach Induktionsstart. Nach 150 min Induktion erreichten die Kulturen eine optische Dichte zwischen 2,7 und 3,0 und wurden abgebrochen.

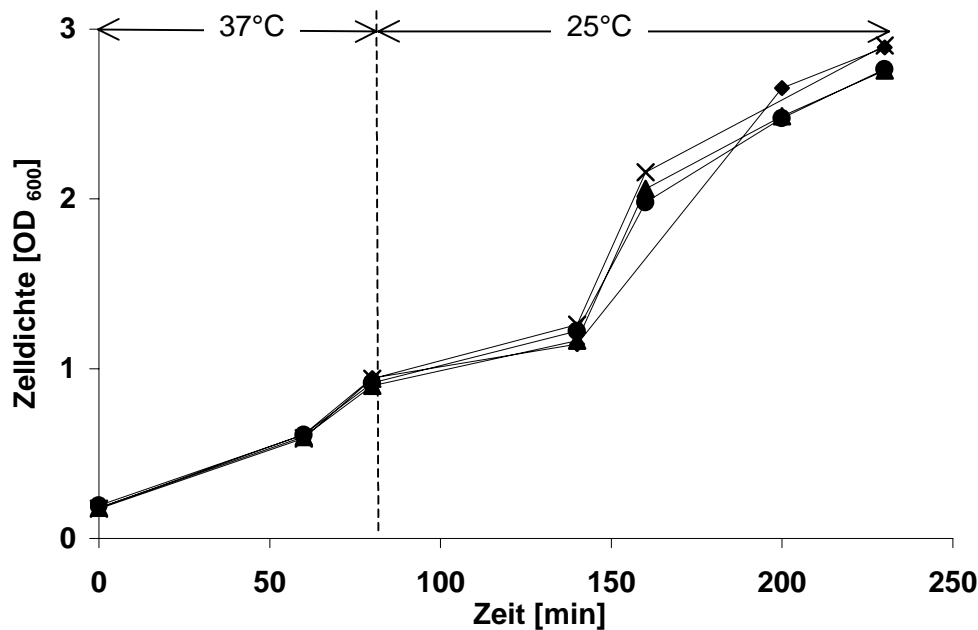


Abbildung 36: Wachstumskurven von vier parallel durchgeführten Schüttelkolbenansätzen (▲, K1; ■, K2; ◆, K3; ✕, K4) des Klons pGEX-2T-S1 im 250 ml Maßstab. Induziert wurde mit 0,5 mM IPTG bei 25°C und einer OD₆₀₀ zwischen 0,90 und 0,95 für 150 min. Der Induktionsstart (t = 70 min) und der Temperaturshift von 37°C auf 25°C sind mit einer gestrichelten Linie markiert.

3.4.2 Wachstumsverläufe der Fermentationen 1 und 2 des Klons pGEX-2T-S1 im 25 Liter Maßstab

Es wurden zwei Fermentationen (Fermentation 1 und Fermentation 2) im Bioreaktor durchgeführt. Im Bioreaktor werden durch die effizientere Sauerstoffversorgung (siehe 2.6.2.3) höhere Zelldichten erreicht als im Schüttelkolben. Während die Zellen in Schüttelkolben bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 3,0 anwachsen, werden im Bioreaktor Zelldichten bis zu einer OD₆₀₀ von 6,0 erreicht. Die im Vergleich zum Schüttelkolben bessere Sauerstoffversorgung der Zellen führt auch zu einer länger andauernden logarithmischen Wachstumsphase. Da durch den Temperaturshift bei Induktionsstart eine Verlangsamung des Wachstums der Zellen eintritt, wurde eine geringere finale Zelldichte von ca. OD₆₀₀ 4,0 im Bioreaktor erwartet. Bei halbmaximaler Zelldichte

befinden sich die Zellen in der Regel in der logarithmischen Wachstumsphase, weshalb bei Zelldichten von OD_{600} von ca. 2,0 induziert wurde.

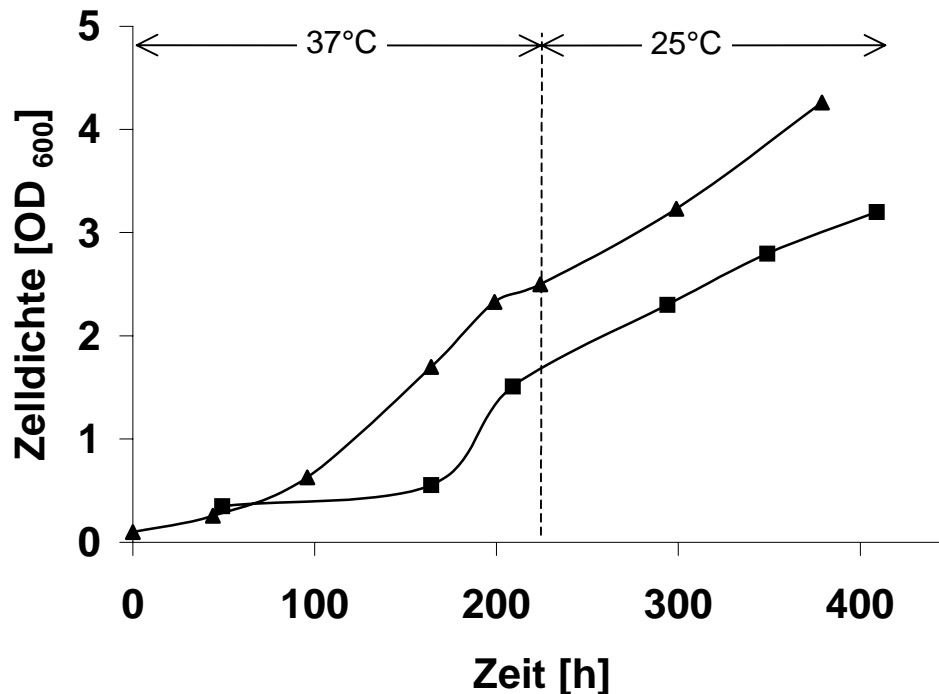


Abbildung 37: Wachstumskurven der Fermentationen 1 (■) und 2 (▲) des Klon pGEX-2T-S1 im 25 Liter Maßstab. Fermentation 1: induziert wurde mit 0,1 mM IPTG bei 25°C und einer OD_{600} von ca. 2,0 für 190 min. Fermentation 2: induziert wurde mit 1 mM IPTG bei 25°C und einer OD_{600} von 2,3 für 155 min. Der Induktionsstart und der Temperaturshift vom 37°C auf 25°C sind mit einer gestrichelten Linie markiert.

In Fermentation 1 wurde mit 0,1 mM IPTG bei 25°C und einer OD_{600} von ca. 2,0 für 190 min induziert. Die Induktionsbedingungen wurden in Fermentation 2 etwas verändert, um höhere Ausbeuten an GST-Sialidase zu erreichen. Es wurde mit 1 mM IPTG bei 25°C und einer OD_{600} von 2,3 für 155 min induziert. Die Wachstumskurven der beiden Fermentationen vor und nach der Induktion sind in Abbildung 37 gezeigt. Die Zunahme der Zelldichte mit steigender Kultivierungsdauer zeigte bei beiden Fermentationen einen sehr ähnlichen Verlauf. Nach der Initialphase stieg die Zelldichte bis zur Induktion exponentiell an. Nach Temperaturshift von 37°C auf 25°C und

nachfolgendem Induktionsstart verringerte sich die Wachstumsgeschwindigkeit. Nach Erreichen der vorgegebenen Induktionszeiten wurden die Fermentationen beendet und der Reaktorinhalt zur Aufreinigung der GST-Sialidase eingesetzt (siehe 2.6.3.3). Bei Induktionsende lag in Fermentation 1 eine OD_{600} von 3,2 und in Fermentation 2 eine OD_{600} von 4,3 vor.

Die Wachstumsverläufe der Kultivierungen in Schüttelkolben entsprachen tendenziell den entsprechenden Verläufen im Bioreaktor. Durch die Vergrößerung des Kulturvolumens kam es nicht zu einem veränderten Zellwachstum. Eine Maßstabsvergrößerung von 250 ml auf 25 Liter wurde erfolgreich durchgeführt.

3.5 Aufreinigung der GST-Sialidase

3.5.1 Beispiele für die Aufreinigung der GST-Sialidase aus Schüttelkolbenansätzen des Klons pGEX-2T-S1 im 250 ml und im 1 Liter Maßstab

Zur Isolierung der GST-Sialidase mittels Affinitätschromatographie aus Produktionsansätzen im 25 Liter Maßstab wurden zunächst Vorversuche mit 250 ml und 1 Liter Produktionsansätzen durchgeführt. Dazu wurde die GST-Sialidase aus Schüttelkolbenansätzen des Klons pGEX-2T-S1 mittels Glutathion Sepharose Säulenchromatographie aufgereinigt.

3.5.1.1 Aufreinigung der GST-Sialidase aus einem 250 ml Schüttelkolben

Ein 250 ml Schüttelkolbenansatz wurde für 2 h mit 1mM IPTG bei 25°C und einer OD₆₀₀ von 1,0 induziert, die Zellen aufgeschlossen und die Lysate mit 2 ml gepacktem Säulenvolumen Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt. Die Ergebnisse der affinitätschromatographischen GST-Sialidase Aufreinigung sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Glutathion Sepharose 4B Affinitätssäulenchromatographie von GST-Sialidase aus einem 250 ml Schüttelkolben.

<i>Schritt</i>	<i>Aktivität</i> <i>U [μmol / min]</i>	<i>Protein</i> <i>[mg]</i>	<i>spezifische</i> <i>Aktivität</i> <i>[U / mg Protein]</i>	<i>Ausbeute</i> <i>[%]</i>	<i>Konzentrierungs-</i> <i>faktor</i> <i>[fach]</i>
Lysat	0,408 (± 0,011)	30,28 (± 0,76)	0,013 (± 0,001)	100	1
vereinigte Fraktionen	0,155 (± 0,004)	0,267 (± 0,006)	0,581 (± 0,039)	38	45

Aus einem 250 ml Schüttelkolbenansatz wurden 267 μg GST-Sialidase isoliert. Die spezifische Aktivität wurde um das 45 fache angereichert. 38 % der Sialidaseaktivität im Lysat konnten in den vereinigten Fraktionen (siehe Tabelle 32) nachgewiesen werden.

3.5.1.2 SDS-PAGE der affinitätschromatographisch gereinigten GST-Sialidase aus einem 1 Liter Produktionsansatz

Eine weitere Aufreinigung des exprimierten GST-Sialidase Fusionsproteins erfolgte aus einem 1 Liter Produktionsansatz. Dazu wurden vier 250 ml Schüttelkolbenansätze mit 0,5 mM IPTG bei 25°C und einer OD_{600} von 0,7 für 2 h induziert, die Zellen aufgeschlossen und die vereinigten Lysate mit 2 ml gepacktem Säulenbettvolumen Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt. Ausgangslysate, Säulendurchlauf und die GST-Sialidase enthaltenden 2 ml Fraktionen wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie Blue angefärbt (siehe Abbildung 38).

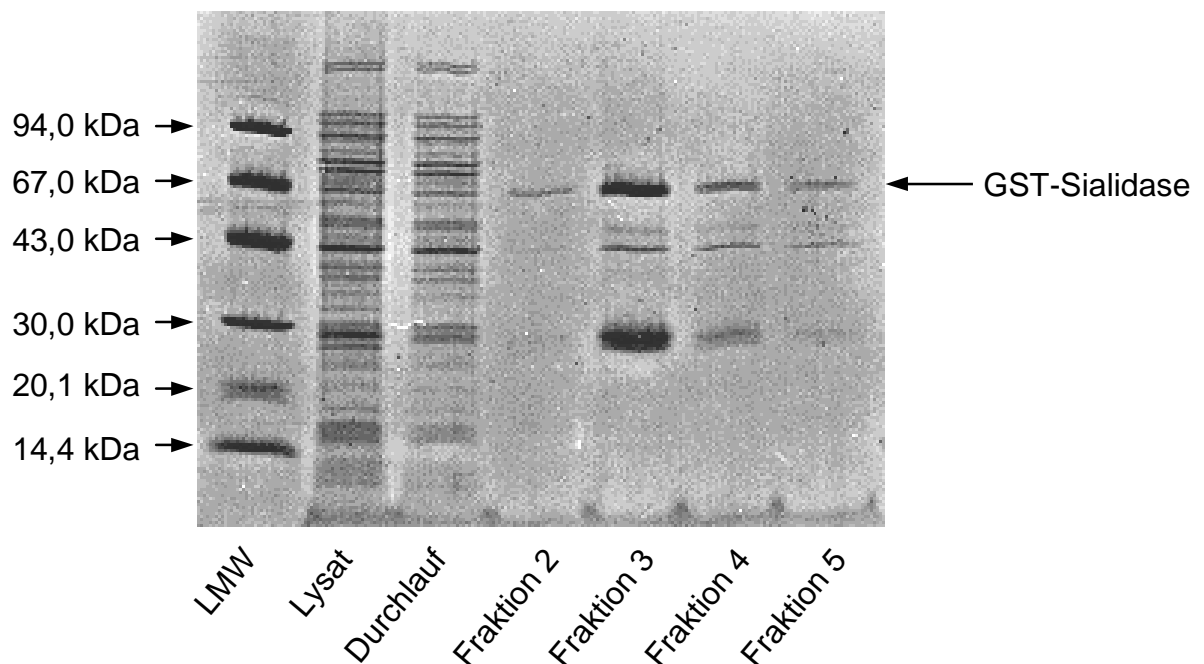


Abbildung 38: SDS-PAGE der Affinitätschromatographie-Eluate aus einem 1 Liter GST-Sialidase Produktionsansatz. Die Eluat-Fraktionen 2 bis 5 sowie das Ausgangslysate und der Säulendurchlauf wurden auf einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blue gefärbt. LMW, 14-94 kDa.

Um die Bildung von Einschlußkörpern zu verringern, wurden die Zellen bei einer Temperatur von 25°C induziert. Da durch die Temperaturniedrigung die Expression der GST-Sialidase reduziert wurde, war die GST-Sialidase Proteinbande im bakteriellen Ausgangslysat nicht von den Banden der zelleigenen Proteine zu unterscheiden. Die GST-Sialidase wurde bereits in der zweiten Eluat-Fraktion nachgewiesen. Die Hauptmenge an GST-Sialidase Fusionsprotein eluiert mit der 3. Fraktion. Nach Durchfluß des 5 fachen Säulenvolumens Elutionspuffer ist das gebundene Fusionsprotein vollständig eluiert. Zusätzlich zur Bande der GST-Sialidase wurden zwei weitere Proteinbanden bei ca. 30 kDa und bei ca. 43 kDa gefunden bei denen es sich vermutlich um nicht vollständig translatiertes GST-Sialidase Fusionsprotein oder um Fragmente der GST-Sialidase handelt.

3.5.1.3 Elutionsprofil der GST-Sialidase Aufreinigung aus einem 1 Liter Produktionsansatz

Eine erneute Aufreinigung des exprimierten GST-Sialidase Fusionsproteins erfolgte aus einem 1 Liter Produktionsansatz. Dazu wurden vier 250 ml Schüttelkolbenansätze mit 0,5 mM IPTG bei 25°C und einer OD₆₀₀ von 0,7 für 2 h induziert, die Zellen aufgeschlossen und die vereinigten Lysate mit 4 ml gepacktem Säulenvolumen Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt (siehe Abbildung 39). Das Elutionsprofil der Aufreinigung wurde aufgenommen. Dabzu wurde die Proteinelution postchromatographisch mittels UV-Detektion gemessen (siehe 2.8.2.3). Die Fraktionen 3 bis 7 mit Sialidaseaktivität korrelieren mit dem Proteinsignal in diesem Bereich des Elutionsprofils.

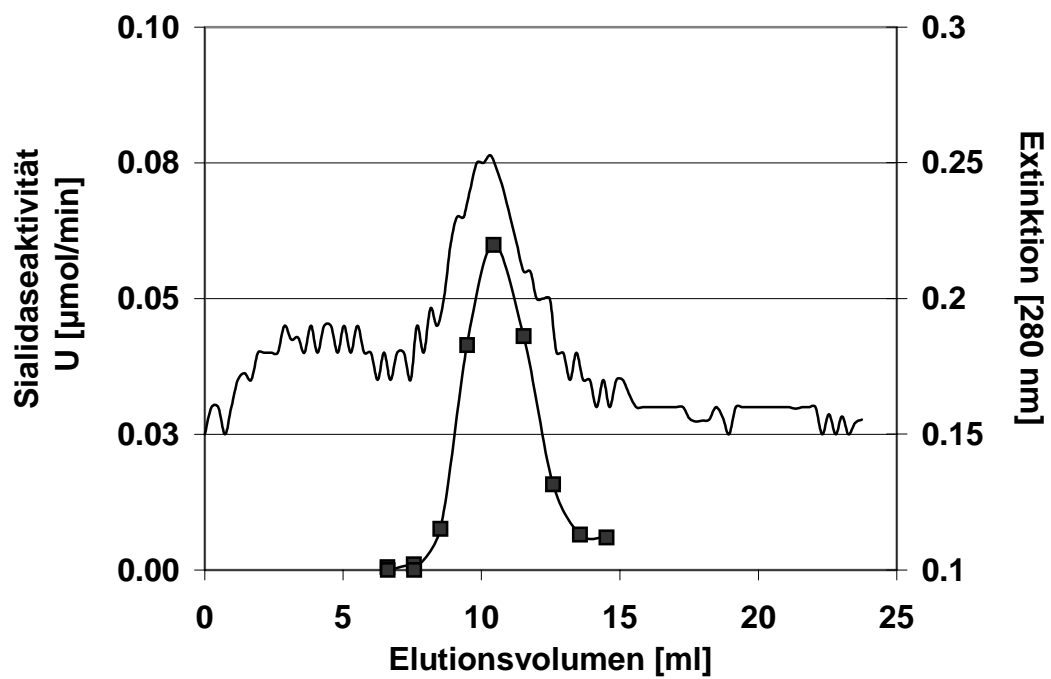


Abbildung 39: Elutionsprofil einer Glutathion Sepharose 4B Affinitätschromatographie aus einem 1 Liter GST-Sialidase Produktionsansatz. Extinktion bei 280 nm (—); Sialidaseaktivität der Eluat-Fractionen 1 bis 9 (■).

3.5.2 Aufreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 und Fermentation 2 des Klons pGEX-2T-S1 im 25 Liter Maßstab

Die GST-Sialidase wurde mittels Glutathion Sepharose 4B aus dem Zellmaterial der Fermentation 1 und der Fermentation 2 aufgereinigt. Fermentation 1 diente der Produktion hochreiner GST-Sialidase zur Herstellung polyklonaler Antikörper. In Fermentation 2 wurde GST-Sialidase für die nachfolgende Untersuchung der Enzymaktivität und der Substratspezifität produziert.

3.5.2.1 Affinitätsaufreinigung der GST-Sialidase aus der Fermentation 1 mit Glutathion Sepharose 4B

In Fermentation 1 wurde mit 0,1 mM IPTG bei 25°C und einer OD₆₀₀ von ca. 2,0 für 190 min induziert. Die Fermentation wurde wie unter Punkt 2.6.2.3 beschrieben durchgeführt, die Zellen wie beschrieben aufgeschlossen (2.6.3.3) und die GST-Sialidase mittels Säulenchromatographie mit 10 ml Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt. Die Glutathion Sepharose 4B wurde viermal beladen, anschließend in die Säule gefüllt und die GST-Sialidase eluiert (siehe 2.8.2.3). Das eluierte Fusionsprotein wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit Sialidaseaktivität wurden vereinigt und die Ausbeuten bestimmt. In Tabelle 33 sind die Aufreinigungsschritte und die Aufreinigungsdaten dargestellt. Die Aufreinigungsergebnisse aus Fermentation 1 stimmen mit denen des 250 ml GST-Sialidase Produktionsansatzes (siehe Tabelle 32) weitgehend überein, obwohl beim 250 ml Produktionsansatz unter anderen Bedingungen induziert wurde. Im Vergleich zum Schüttelkolbenansatz, bei dem aus 250 ml Kulturvolumen 0,267 mg Enzym aufgereinigt wurde, konnten aus dem Bioreaktor aus einem Kulturvolumen von 25 Litern entsprechend 26,46 mg aufgereinigt werden. Im Lysat der Fermenterkultur ist die spezifische Aktivität mit 0,025 U/mg Protein deutlich höher als im Lysat des Schüttelkolbenansatzes mit 0,013 U/mg. Im Bioreaktor wurde, bezogen auf die Gesamtproteinmenge, mehr aktives Enzym gebildet als im Schüttelkolbenansatz.

Tabelle 33: Glutathion Sepharose 4B Affinitätschromatographie von GST-Sialidase aus Fermentation 1.

<i>Schritt</i>	<i>Aktivität</i> <i>U [μmol / min]</i>	<i>Protein</i> <i>[mg]</i>	<i>spezifische</i> <i>Aktivität</i> <i>[U / mg Protein]</i>	<i>Ausbeute</i> <i>[%]</i>	<i>Konzentrierungs-</i> <i>faktor</i> <i>[fach]</i>
bakterielles Lysat	113,35 (± 21,44)	4503,21 (± 147,60)	0,025 (± 0,016)	100	1
filtriertes Lysat	94,47 (± 2,06)	4163,08 (± 141,45)	0,023 (± 0,002)	83,3	1
vereinigte Fraktionen	26,45 (± 1,11)	26,46 (± 0,76)	0,999 (± 0,121)	23,3	40

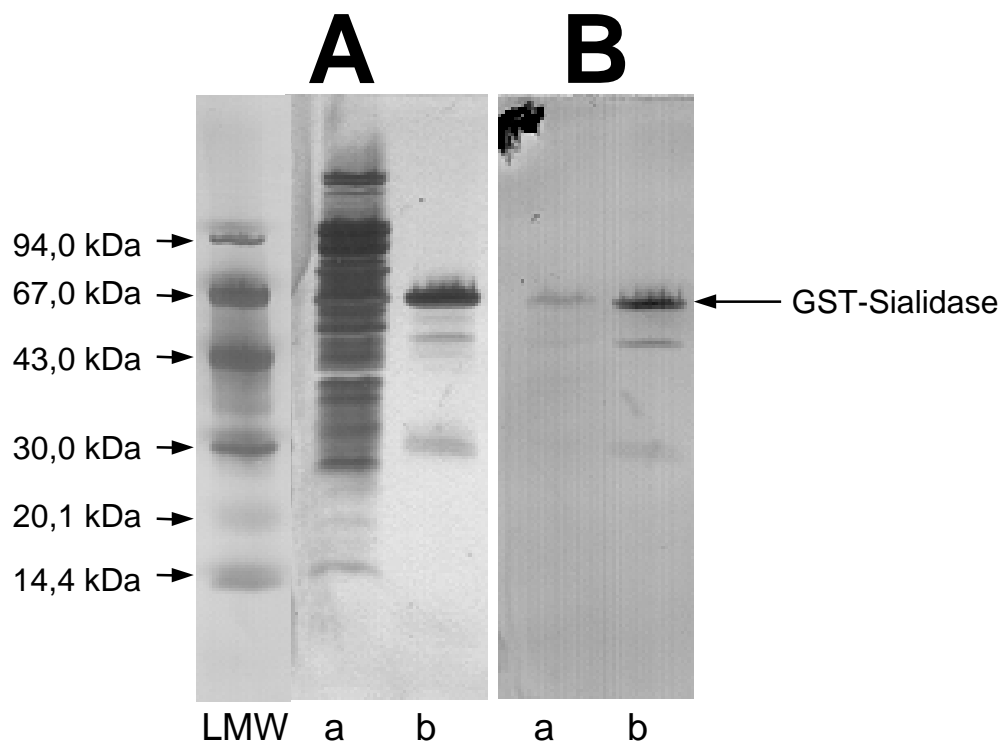


Abbildung 40: SDS-PAGE (A) und Immunoblot (B) des Lysats (a) und der mittels Glutathion Sepharose 4B isolierten GST-Sialidase (b) aus Fermentation 1. Die Lysate und die isolierte GST-Sialidase wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und im Immunoblot mit einem Ziege Anti-GST Antikörper detektiert. LMW, 14-94 kDa. Die Proteinbanden im Gel wurden mit Silber gefärbt.

Die Lysate und das Isolat aus Fermentation 1 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im nachfolgenden Immunoblot wurde der GST-Anteil mit einem polyklonalen Ziege Anti-GST Antikörper detektiert (siehe Abbildung 40). Die GST-Sialidase wurde als intensiv gefärbte Bande bei ca. 70 kDa nachgewiesen (siehe Abbildung 40, B, b). Der Vergleich des im SDS-Gel aufgetrennten Lysats mit der isolierten GST-Sialidase zeigt die erfolgreiche Aufreinigung des Fusionsproteins (siehe Abbildung 40, A). Durch die Affinitätsreinigung wurde die GST-Sialidase in einem Aufreinigungsschritt aus dem Lysat isoliert. Neben dem Hauptprotein wurden keine Proteinkontaminationen nachgewiesen. Im Bereich von ca. 30 kDa und ca. 50 kDa wurden zwei schwache Proteinbanden mit Silberfärbung und mit dem Antikörper detektiert (siehe Abbildung 40, B, b). Da mit dem Antikörper der GST-Anteil spezifisch nachgewiesen wird, ist die schwache Antikörper-Bindung an die Proteine bei ca. 50 kDa und ca. 30 kDa ein Hinweis darauf, daß das Fusionsprotein zu einem geringen Anteil unvollständig prozessiert oder proteolytisch degradiert wurde.

3.5.2.2 Affinitätsaufreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 2 mit Glutathion Sepharose 4B

Die Induktionsbedingungen wurden in Fermentation 2 verändert, um höhere Aubeuten an GST-Sialidase zu erreichen. Es wurde mit 1 mM IPTG bei 25°C und einer OD₆₀₀ von 2,3 für 155 min induziert. Die Fermentation wurde wie unter Punkt 2.6.2.3 beschrieben durchgeführt, die Zellen wie beschrieben aufgeschlossen (2.6.3.3) und die GST-Sialidase mittels Säulenchromatographie mit 20 ml Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt. Die Glutathion Sepharose 4B wurde dreimal beladen, anschließend in die Säule gefüllt und die GST-Sialidase eluiert (siehe 2.8.2.3). Das eluierte Fusionsprotein wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit Sialidaseaktivität wurden vereinigt und die Ausbeuten bestimmt. In Tabelle 34 sind die Aufreinigungsschritte und die Aufreinigungsdaten dargestellt. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Affinitätsaufreinigung aus Fermentation 1 zeigten sich große Unterschiede in den Sialidaseaktivitäten der Lysate. Im Lysat der ersten Fermentation konnte mit 113,35 U eine sechsmal höhere Sialidaseaktivität ermittelt werden als im Lysat der Fermentation 2, obwohl in Fermentation 2 eine höhere IPTG-Konzentration eingesetzt wurde. Allerdings wurde in Fermentation 2 eine Glycerinkultur des Klons pGEX-2T-S1

eingesetzt und keine frisch transformierten Zellen, was zu einer verringerten Produktion führen kann [Hengen, 1996]. Trotz der geringen Sialidaseaktivität im Lysat konnten 13,8 mg Protein mit einer spezifischen Aktivität von 0,891 U / mg Protein aufgereinigt werden. Mit einer Ausbeute von 68 % war die Affinitätsaufreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 2 effektiver als die Aufreinigung aus Fermentation 1 und den Schüttelkolbenkulturen, bei denen nur Ausbeuten von 20-30 % erzielt wurden. Die spezifische Aktivität der vereinigten Fraktionen konnte im Vergleich zum Lysat um das 178,2 fache angereichert werden. In Fermentation 2 war der Anteil produzierter GST-Sialidase am Gesamtproteingehalt mit 0,005 U / mg Protein geringer als in Fermentation 1 mit 0,025 U / mg Protein. Die spezifische Aktivität kann als Maß für die Qualität des GST-Sialidase Fusionsproteins angesehen werden. Die spezifische Aktivität der aufgereinigten GST-Sialidase aus Fermentation 1 mit 0,999 U / mg Protein unterscheidet sich nur wenig vom Wert für Fermentation 2 mit 0,891 U / mg Protein. Es konnte aus beiden Fermentationen ein identisches Protein aufgereinigt werden.

Tabelle 34: Glutathion Sepharose 4B Affinitätschromatographie von GST-Sialidase aus Fermentation 2.

Schritt	Aktivität <i>U [μmol / min]</i>	Protein <i>[mg]</i>	spezifische Aktivität <i>[U / mg Protein]</i>	Ausbeute <i>[%]</i>	Konzentrierungs- faktor <i>[fach]</i>
bakterielles Lysat	18,11 (± 2,56)	3645,3 (± 153,8)	0,005 (± 0,003)	100	1
vereinigte Fraktionen	12,31 (± 0,01)	13,8 (± 0,5)	0,891 (± 0,203)	68	178,2

3.5.3 Feinreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 mittels Q Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration

Zur Gewinnung hochreiner GST-Sialidase wurden die vereinigten affinitätschromatographisch gereinigten GST-Sialidase-haltigen Fraktionen aus Fermentation 1 (siehe Tabelle 33) zusätzlich noch mittels Q-Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration mit einer Superdex 200 PG Säule aufgereinigt.

3.5.3.1 Feinreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 mittels Q Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie

Zur weiteren Feinreinigung wurden 26,46 mg affinitätsgereinigte GST-Sialidase aus Fermentation 1 mit einer spezifischen Aktivität von 0,999 U/mg Protein auf eine Q Sepharose FF Säule aufgetragen und wie unter Punkt 2.8.3 beschrieben eluiert. In Tabelle 35 sind die Aufreinigungsdaten der Ionenaustauschchromatographie mit Q Sepharose FF zusammengefaßt.

Tabelle 35: Q Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie von GST-Sialidase aus Fermentation 1 nach Affinitätschromatographie.

<i>Schritt</i>	<i>Aktivität</i> <i>U [μmol / min]</i>	<i>Protein</i> <i>[mg]</i>	<i>spezifische</i> <i>Aktivität</i> <i>[U / mg Protein]</i>	<i>Ausbeute</i> <i>[%]</i>	<i>Konzentrations-</i> <i>faktor</i> <i>[fach]</i>
vereinigte Fraktionen der Affinitätschromatographie	26,45 (± 1,11)	26,46 (± 0,76)	0,999 (± 0,121)	100	1
vereinigte Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie	4,42 (± 0,29)	4,43 (± 0,20)	0,998 (± 0,287)	16,7	1

Aus 26,46 mg affinitätschromatographisch gereinigter GST-Sialidase konnten 4,43 mg mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden. Die spezifische Sialidaseaktivität konnte nicht angereichert werden und die Ausbeute betrug nur 16,7 %. Abbildung 41 zeigt den Elutionsverlauf der Ionenaustauschchromatographie. Die GST-Sialidase eluiert in einem scharfen Peak bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM. Nicht-gebundenes Protein erscheint als breiter Peak im Durchlauf vor dem Start des Salz-Gradienten.

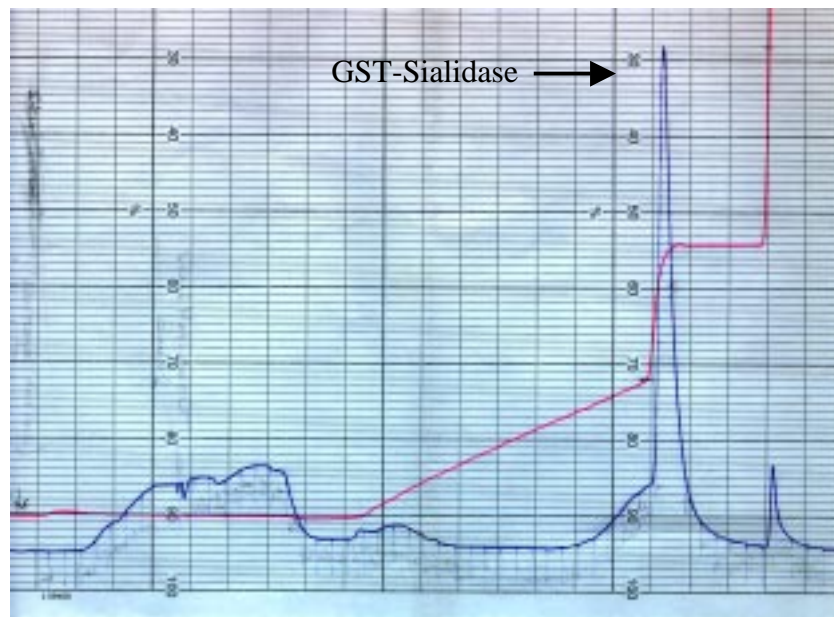


Abbildung 41: Elutionsprofil der Q Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie mit GST-Sialidase aus Fermentation 1. Extinktion bei 280 nm (blau) und Elutionsgradient (rot).

Der gesammelte Durchlauf und die Fraktionen, die Sialidaseaktivität enthielten, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abbildung 42). Obwohl im Durchlauf keine signifikante Sialidaseaktivität gemessen werden konnte, erscheint eine intensive Proteinbande bei 70 kDa sowohl im Durchlauf (siehe Abbildung 42, Bahn 3) als auch in den gesammelten Fraktionen mit Sialidaseaktivität (siehe Abbildung 42, Bahn 4).

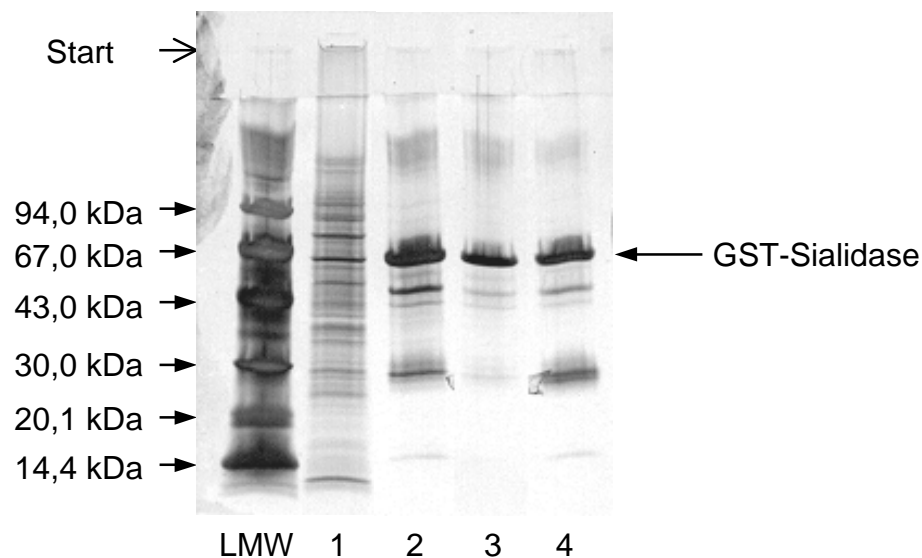


Abbildung 42: SDS-PAGE des Lysats (1), der affinitätsgereinigten GST-Sialidase (2), des Durchlaufs der Ionenaustauschchromatographie (3) und der mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigten GST-Sialidase (4). LMW, 14-94 kDa. Die Proteine wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

Da es bei der Aufreinigung der GST-Sialidase mittels Ionenaustauschchromatographie außerdem zu einem deutlichen Aktivitätsverlust kam (siehe Tabelle 35), ist davon auszugehen, daß die GST-Sialidase Aggregate bildet, die ein unterschiedliches Bindungsverhalten bei verschiedenen Salzkonzentrationen zeigen und zur Inaktivierung des Enzyms führen. Dieses Phänomen wurde bereits für die GST [JI et al., 1992] und für einige GST-Fusionsproteine beschrieben [MARU et al., 1996].

3.5.3.2 Feinreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 mittels Gelfiltration

Die mittels Affinitätschromatographie und Q Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie aufgereinigte GST-Sialidase (4,43 mg) wurde auf eine Superdex 200 PG Säule aufgetragen und wie in 2.8.4 beschrieben eluiert (siehe Abbildung 43). Sialidaseaktivitäten in einzelnen Fraktionen konnten über einen weiten

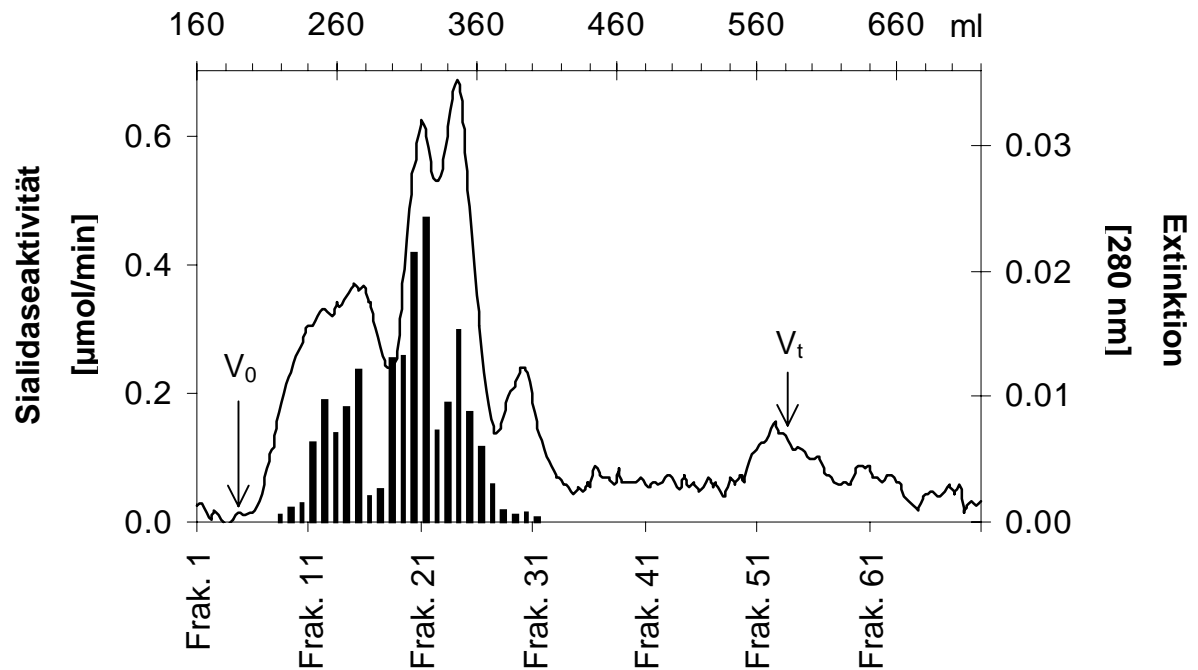


Abbildung 43: Elutionsprofil der Gelfiltration zur Feinreinigung der GST-Sialidase. Dargestellt sind die Extinktion bei 280 nm (Linie) bezogen auf das Durchlaufvolumen und die Sialidaseaktivitäten (Säulen) in den Fraktionen. V_0 , Ausschlußvolumen (190 ml); V_t , Totsäulenvolumen (585 ml).

Molekulargewichtsbereich (Fraktionen 8 bis 31) nachgewiesen werden. Auch in Fraktionen des hochmolekularen Bereichs (Fraktion 8 bis Fraktion 15) konnte Aktivität nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß es sich hier um GST-Sialidase-Aggregate handelt.

Die Gelfiltrations-Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Die Fraktionen 12, 16, 21, 25 und 31 wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und die Proteinbanden mit Silber gefärbt (siehe Abbildung 44). In den Fraktionen 12, 16, 21 und 25 erscheint die GST-Sialidase Proteinbande bei ca. 70 kDa im SDS-Gel (siehe Abbildung 44, a-d), während in Fraktion 31 (siehe Abbildung 44, e) nur eine schwache Bande dieser Proteingröße zu erkennen ist. In Fraktion 25 und 31 (siehe Abbildung 44, d und e) konnte eine andere schwache Proteinbande bei ca. 30 kDa und in den Fraktionen 12, 16, 21 und 25 (siehe Abbildung 44, a-d) noch eine weitere bei ca. 50 kDa

detektiert werden. Der Vergleich zwischen den Sialidaseaktivitäten (siehe Abbildung 43) und den detektierten Proteinbanden der Fraktionen zeigt, daß in den Fraktionen, in denen die GST-Sialidase-Bande nachgewiesen wurde, auch Sialidaseaktivität gemessen werden konnte. Da in den Fraktionen 12 und 16 (siehe Abbildung 44, a und b) keine hochmolekularen Bestandteile im Gel detektiert wurden, ist davon auszugehen, daß die GST-Sialidase in diesen Fraktionen in Form von Aggregaten vorliegt. Bei den schwachen Proteinbanden im SDS-Gel, handelt es sich entweder um unvollständig gebildetes oder proteolytisch verdautes GST-Sialidase Fusionsprotein; dabei könnte das Protein, das bei 30 kDa sichtbar ist, den GST-Anteil des Fusionsproteins repräsentieren. In Fraktion 21 (siehe Abbildung 44, c) wurde die höchste Sialidaseaktivität nachgewiesen (siehe Abbildung 43). Da in diesem Bereich Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa eluieren, ist in dieser Fraktion vornehmlich die vollständige GST-Sialidase vorhanden.

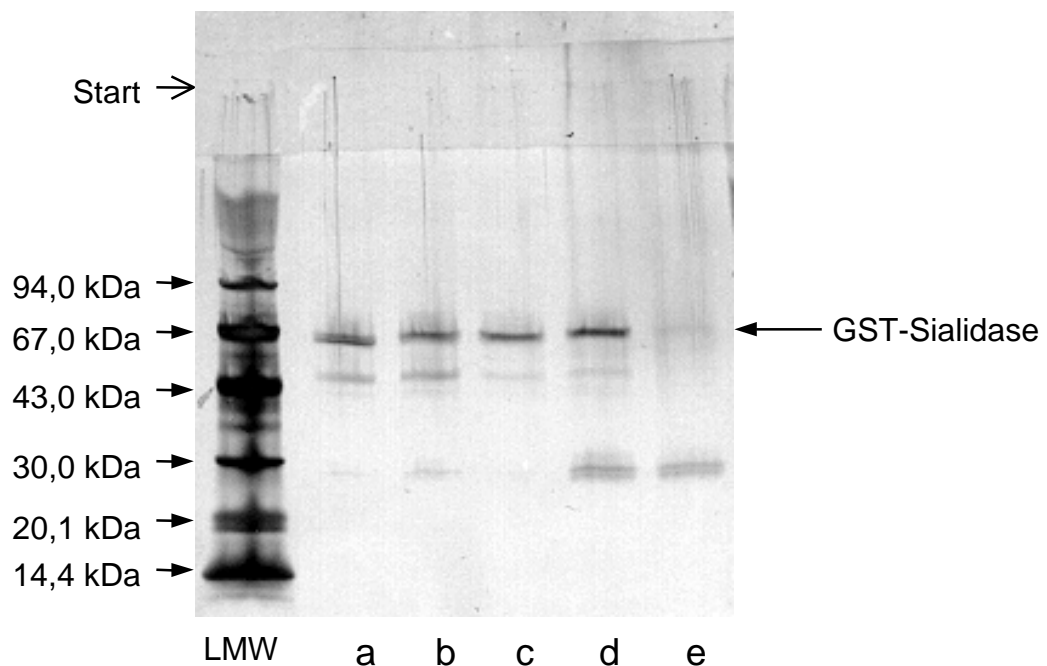


Abbildung 44: SDS-PAGE der Fraktionen 12 (a), 16 (b), 21 (c), 25 (d) und 31 (e) der Gelfiltration der GST-Sialidase aus Fermentation 1 (siehe Abbildung 43). LMW, 14-94 kDa. Die Proteine wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

Die Fraktionen 19-22, in denen die höchsten Aktivitäten gemessen wurden und die in einem Molekulargewichtsbereich liegen, der der Größe der GST-Sialidase entspricht, wurden vereinigt. In Tabelle 36 sind die Aufreinigungsdaten aufgeführt.

Tabelle 36: Gelfiltration von GST-Sialidase aus Fermentation 1.

<i>Schritt</i>	<i>Aktivität</i> <i>U [μmol / min]</i>	<i>Protein</i> <i>[mg]</i>	<i>spezifische</i> <i>Aktivität</i> <i>[U / mg Protein]</i>	<i>Ausbeute</i> <i>[%]</i>	<i>Konzentrations-</i> <i>faktor</i> <i>[fach]</i>
vereinigte Fraktionen der Ionenaustausch- chromatographie	4,42 (± 0,29)	4,43 (± 0,20)	0,998 (± 0,287)	100	1
vereinigte Fraktionen der Gelfiltration	2,67 (± 0,06)	0,77 (± 0,04)	3,478 (± 0,383)	60	3,5

Mittels Gelfiltration wurden aus den GST-Sialidase-enthaltenden Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie 770 μg hochreine GST-Sialidase aufgereinigt. Die spezifische Aktivität wurde dabei um das 3,5 fache gesteigert. 60 % der in den vereinigten Ionenaustauschchromatographie-Fraktionen vorhandenen Aktivität wurde in den vereinigten Gelfiltrations-Fraktionen nachgewiesen. Die hochreine GST-Sialidase wurde zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt.

3.5.3.3 Zusammenfassung der Feinreinigung der GST-Sialidase

Die Feinreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 sollte sicherstellen, daß hochreines Protein zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers isoliert wurde. In Tabelle 37 sind die Ergebnisse der einzelnen Aufreinigungsschritte von der Affinitätschromatographie bis zur Gelfiltration zusammengefaßt. Es konnten 770 μg hochreine GST-Sialidase mit einer spezifischen Aktivität von 3,48 U/mg Protein aufgereinigt werden. Die Ausbeute betrug 2,4 % der ursprünglichen Sialidaseaktivität der produzierten Sialidase (siehe Tabelle 37); dabei konnte die spezifische Aktivität 138 fach angereichert werden. Die Affinitätsaufreinigung der GST-Sialidase aus Fermentation 1 mit Glutathion Sepharose 4B führte zu einer 40 fachen Anreicherung der

spezifischen Aktivität (siehe Tabelle 33). Durch die Aggregatbildung des Fusionsproteins ging bei der Ionenaustausch-chromatographie ein Teil der Sialidaseaktivität verloren, ohne daß die spezifische Aktivität dadurch angereichert werden konnte. Durch die Gelfiltration konnte die spezifische Aktivität noch einmal von 0,998 auf 3,478 U/mg Protein erhöht werden. Durch die Untersuchung der einzelnen Fraktionen der Gelfiltration konnte die Aggregatbildung des GST-Sialidase Fusionsproteins bestätigt werden.

Tabelle 37: Zusammenfassung der Aufreinigung von GST-Sialidase aus Fermentation 1.

<i>Schritt</i>	<i>Aktivität</i> <i>U [μmol / min]</i>	<i>Protein</i> <i>[mg]</i>	<i>spezifische</i> <i>Aktivität</i> <i>[U / mg Protein]</i>	<i>Ausbeute</i> <i>[%]</i>	<i>Konzentrations-</i> <i>faktor</i> <i>[fach]</i>
bakterielles Lysat	113,35 (± 21,44)	4503,21 (± 147,60)	0,025 (± 0,016)	100	1
filtriertes Lysat	94,47 (± 2,06)	4163,08 (± 141,45)	0,023 (± 0,002)	83,3	1
vereinigte Fraktionen der Affinitäts- chromatographie	26,45 (± 1,11)	26,46 (± 0,76)	0,999 (± 0,121)	23,3	40
vereinigte Fraktionen der Ionenaustausch- chromatographie	4,42 (± 0,29)	4,43 (± 0,20)	0,998 (± 0,287)	3,9	40
vereinigte Fraktionen der Gelfiltration	2,67 (± 0,06)	0,77 (± 0,04)	3,478 (± 0,383)	2,4	138

3.6 Charakterisierung der GST-Sialidase

3.6.1 Inhibitorische Wirkung von Neu5Ac und Neu5Ac2en

Zur weiteren Charakterisierung des produzierten Enzyms wurden Inhibitorstudien durchgeführt. Neu5Ac und Neu5Ac2en sind kompetitive Sialidaseinhibitoren. Ob diese Substanzen die GST-Sialidaseaktivität beeinflussen, sollte in einem Aktivitätstest untersucht werden.

Tabelle 38: Inhibitorische Wirkung von Neu5Ac und Neu5Ac2en auf die GST-Sialidaseaktivität.

<i>Inhibitor</i>	<i>Sialidaseaktivität</i>	
	<i>mU [nmol /min]</i>	<i>%</i>
ohne Inhibitor	0,203	100
Neu5Ac (2 mM)	0,168	83
Neu5Ac (5 mM)	0,163	80
Neu5Ac2en (0,1 mM)	0,103	51
Neu5Ac2en (0,5 mM)	0,052	25

In Tabelle 38 sind die Resultate der Messung mit MUF-Neu5Ac dargestellt. Beide Inhibitoren sind in der Lage, die Sialidaseaktivität des Fusionsproteins zu hemmen. Der Einsatz von Neu5Ac führt zu einer Endprodukthemmung der GST-Sialidase, wobei 2 mM Neu5Ac die Aktivität um ca. 20 % reduzieren. Eine Konzentrationserhöhung des Inhibitors im Testansatz auf 5 mM führte nur zu einer unwesentlichen Erhöhung des Aktivitätsverlustes im Vergleich zu einer Neu5Ac-Konzentration von 2 mM. Neu5Ac2en hingegen hemmt die Sialidaseaktivität sehr viel effektiver als Neu5Ac. Eine Inhibitorkonzentration von 0,1 mM Neu5Ac2en ist bereits ausreichend, um die Aktivität um ca. 50 % zu reduzieren. Bei einer Konzentration von 0,5 mM Neu5Ac2en konnte eine Abnahme der Aktivität um 75 % gemessen werden. Diese Daten stimmen mit den Untersuchungen von MIYAGI et al. (1993a) überein, wonach sowohl Neu5Ac als auch

Neu5Ac2en die Aktivität der cytosolischen Sialidase aus Rattenleber hemmen, Neu5Ac2en aber um ein Vielfaches effektiver inhibiert.

3.6.2 Charakterisierung der Sialidasespezifität mit Hilfe von Gangliosiden aus humanen Granulozyten

Zur Charakterisierung der GST-Sialidase wurden humane Granulozyten Ganglioside als Substrate eingesetzt. Native cytosolische Sialidase aus CHO-Zellen ist in der Lage, sowohl Glykoproteine als auch Ganglioside zu desialylieren [WARNER et al., 1993]. Granulozyten Ganglioside besitzen terminale Neolacto-Typ-II-Sequenzen, wie sie auch in Glykoproteinen zu finden sind. Aus diesem Grund wurden Spezifitätstests mit aufgetrennten Fraktionen dieser Strukturen durchgeführt (Overlay-Assay, siehe 2.9.2.2.2). Als Referenzenzym wurde Test-Neuraminidase aus *V. cholerae* eingesetzt und die Spezifitäten beider Sialidasen miteinander verglichen.

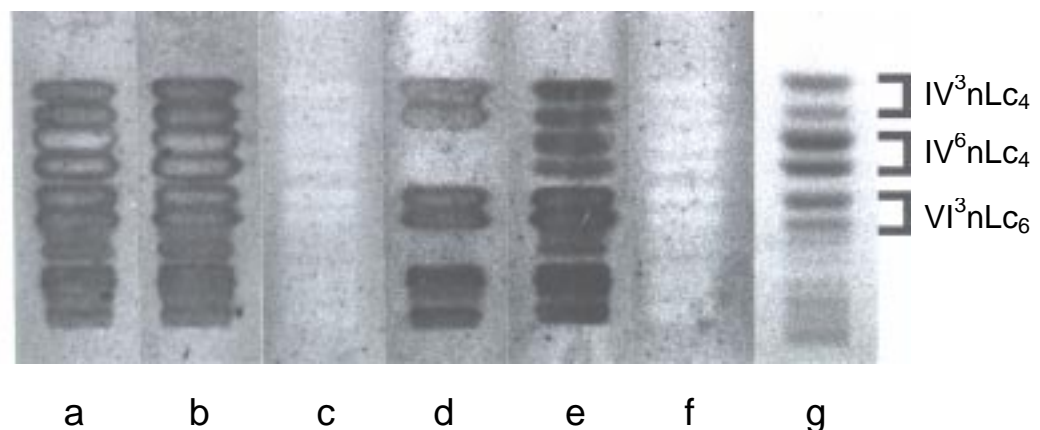


Abbildung 45: Sialidase Behandlung von Gangliosiden aus humanen Granulozyten mit nachfolgendem immunologischen Nachweis der Asialoganglioside mit einem Anti-Gal β (1-4)GlcNAc-R monoklonalen Maus-IgM Antikörper. Hydrolyse von 5 μ g Standardgangliosidmischung humaner Granulozyten Ganglioside mit *V. cholerae* Neuraminidase (0,8 mU / ml, a; 3,2 mU / ml, b) und GST-Sialidase (0,8 mU / ml, d; 3,2 mU / ml, e). Als Kontrollen wurden je 5 μ g Standardgangliosidmischung mit Reaktionspuffer inkubiert (*V. cholerae* Neuraminidase Puffer, c; GST-SialidasePuffer, f). Resorcinolfärbung von 20 μ g Standardgangliosidmischung (g)

Nach der Sialidasebehandlung wurden die desialylierten Strukturen mit einem Anti-Gal β (1-4)GlcNAc-R monoklonalen Maus-IgM Antikörper [YOUNG et al., 1981] nachgewiesen.

Aufgrund der Substitution des Ceramids mit C₁₆- und C₂₄-Fettsäure (C₁₆, untere Bande und C₂₄, obere Bande) chromatographieren Granulozyten Ganglioside auf der HPTLC-Platte (Resorcinolfärbung, Abbildung 45, g) als Doppelbanden. Die Kontrollen ohne Enzym (Abbildung 45, c und f) zeigten keine Kreuzreaktionen des Antikörpers mit den sialylierten Strukturen. *V. cholerae* Neuraminidase und GST-Sialidase besitzen ähnliche Substratspezifitäten. Bei einer Aktivität von 3,2 mU/ml Enzym konnten die korrespondierenden Asialoganglioside der Neolactoserie-Ganglioside IV³- α -Neu5Ac-nLc₄Cer, IV⁶- α -Neu5Ac-nLc₄Cer und VI³- α -Neu5Ac-nLc₆Cer (siehe Tabelle 19) bei beiden Enzymen nachgewiesen werden (Abbildung 45, b und e). Wurden nur 0,8 mU/ml Enzym eingesetzt, zeigte die GST-Sialidase (siehe Abbildung 45, d). im Gegensatz zur *V. cholerae* Neuraminidase (siehe Abbildung 45, a) eine deutliche Präferenz gegenüber α -(2-3)sialylierten Neolactoserie-Gangliosiden.

3.7 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen GST-Sialidase

3.7.1 Präparation der GST-Sialidase Gelfiltrations-Fraktionen

Die vier Gelfiltrationsfraktionen 19-22 (32 ml) (siehe Abbildung 43) wurden zur Immunisierung eines Huhns eingesetzt. Zur Messung der Sialidaseaktivität und der Proteinkonzentration wurde 1 ml der vereinigten Gelfiltrationsfraktionen entnommen und die GST-Sialidase für die Immunisierungen umgepuffert und aufkonzentriert

Tabelle 39: Aufkonzentrierung und Umpufferung der GST-Sialidase für die Immunisierungen.

<i>Schritt</i>	<i>Sialidaseaktivität</i> <i>U [μmol / min]</i>	<i>Protein</i> <i>[mg]</i>	<i>Proteinkonzentration</i> <i>[mg / ml]</i>
vereinigte Fraktionen der Gelfiltration	2,166 (± 0,046)	0,623 (± 0,032)	0,024
Filtrat	0,027 (± 0,004)	0,123 (± 0,031)	0,005
Konzentrat (umgepuffert)	0,067 (± 0,002)	0,364 (± 0,012)	0,364

Tabelle 39 zeigt die Ergebnisse der Aufkonzentrierung und Umpufferung der GST-Sialidase. Das Volumen der Gelfiltrationsfraktionen wurde von 31 ml auf 1 ml aufkonzentriert. Bei der Aufkonzentrierung und Umpufferung verlor die GST-Sialidase über 90 % ihrer Aktivität. Im Konzentrat konnten nur 3,1 % der ursprünglichen Sialidaseaktivität und im Filtrat lediglich 1,2 % nachgewiesen werden. Der Anteil des Proteins im Konzentrat betrug 58,4 % und im Filtrat 19,8 %. Das restliche Protein wurde vermutlich an die Membran gebunden. Es konnten nach Aufkonzentrierung und Umpufferung von 623 μg Enzym (siehe Tabelle 37) 364 μg hochreine GST-Sialidase

erzielt werden. Nach Abnahme von 100 µl zur Messung der Proteinkonzentration und der Sialidaseaktivität wurden 328 µg hochreine GST-Sialidase in 900 µl Phosphatpuffer zur Immunisierung eingesetzt. Da unabhängig von der biologischen Aktivität des Enzyms bei der Immunisierung Antikörper gegen die verschiedenen Epitope der GST-Sialidase gebildet werden, spielte der Aktivitätsverlust im Hinblick auf die Herstellung eines polyklonalen Antiserums eine untergeordnete Rolle. Die umgepufferte und aufkonzentrierte GST-Sialidase wurde zur Erstimmunisierung eingesetzt.

3.7.2 Immunisierung mit GST-Sialidase und Nachweis von Anti-GST-Sialidase Antikörpern in den Antiseren

Die Immunisierung von zwei Hühnern mit je 164 µg (450 µl) hochreiner GST-Sialidase wurde am Institut von Prof. Dr. U. Neumann (Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Geflügel) durchgeführt. Eines der Hühner verstarb in der Folgezeit. Nach vier Wochen wurde dem verbliebenen Huhn Blut entnommen. Aus diesem Blut wurde das Immunserum der Erstimmunisierung gewonnen. Da keinerlei Hinweise darauf vorlagen, daß in den affinitätsaufgereinigten Proben *E. coli* Proteine vorhanden waren, wurde mit 573 µg affinitätsgereinigter und dialysierter GST-Sialidase aus einem 1 Liter Produktionsansatz des Klons pGEX-2T-S1 nachimmunisiert. Zwei Wochen nach der Zweitimmunisierung wurde das Huhn geschlachtet und das Immunserum gewonnen. Mittels Immunoblotting wurde das Präimmunserum (siehe Abbildung 46) sowie die Immunseren der Erstimmunisierung (siehe Abbildung 47) und der Zweitimmunisierung (siehe Abbildung 48) auf Anti-GST-Sialidase-Antikörper getestet. Aus parallelen Schüttelkolbenansätzen des Klons pGEX-2T-S1, des Kontroll-Klons pGEX-2T-S7 und *E. coli* M15 pREP4 Zellen wurden nach 3 h 20 min Induktion mit 0,5 mM IPTG bei 25 °C und einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 1,2, die Test-Lysate hergestellt. Jeweils 1 ml wurde aus den Lysaten zur Durchführung der Immunoblots entnommen. Mit den verbleibenden Lysaten wurde jeweils eine Glutathion Sepharose 4B Affinitätschromatographie durchgeführt.

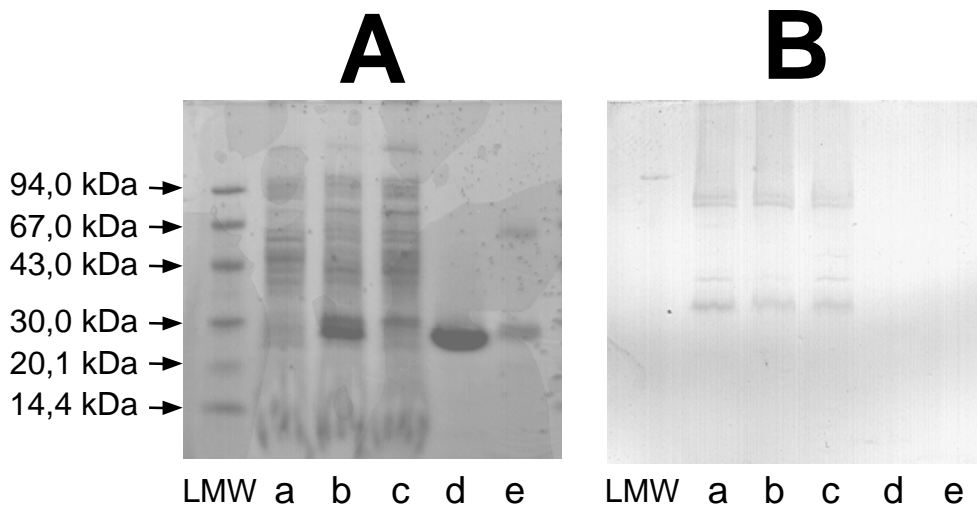


Abbildung 46: SDS-PAGE (A) und Immunoblot des Präimmunsersums (1:50) (B). Lysate aus *E. coli* M15 pREP4 (a), Klon pGEX-2T-S7 (b), Klon pGEX-2T-S1 (c); affinitätsgereinigte GST (d) und GST-Sialidase (e). LMW, 14-94 kDa. Die Proteine wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und im Immunoblot detektiert. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie Blue gefärbt.

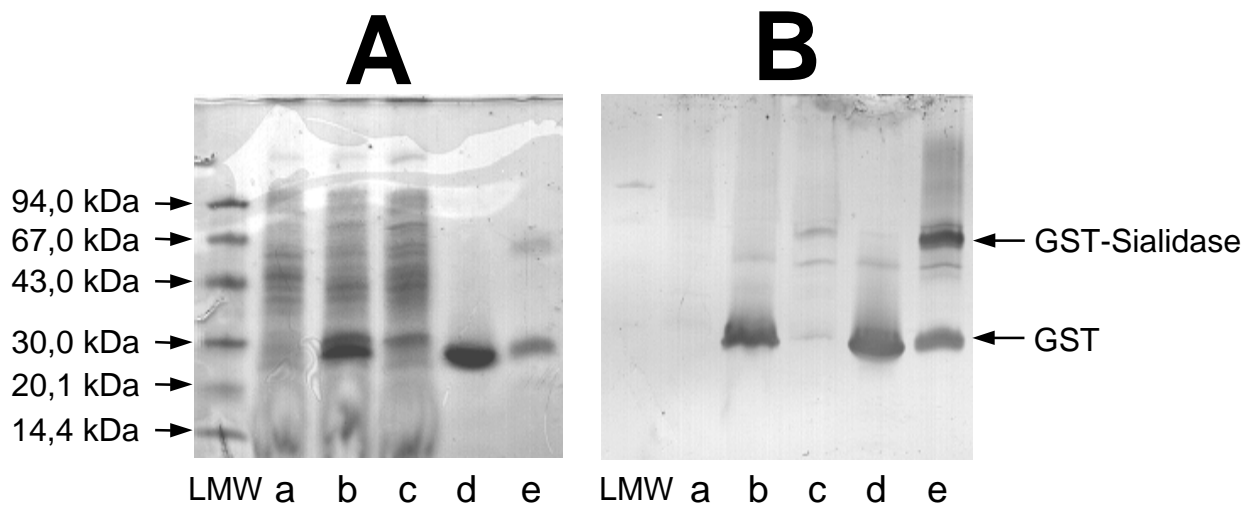


Abbildung 47: SDS-PAGE (A) und Immunoblot des Immunsersums der Erstimmunisierung (1:50) (B). Lysate aus *E. coli* M15 pREP4 (a), Klon pGEX-2T-S7 (b), Klon pGEX-2T-S1 (c); affinitätsgereinigte GST (d) und GST-Sialidase (e); LMW, 14-94 kDa. Die Proteine wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und im Immunoblot detektiert. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie Blue gefärbt.

Das Präimmunserum und das Immunserum der Erstimmunisierung wurden in einer 1:50 fachen Verdünnung eingesetzt. Für das Immunserum der Zweitimmunisierung wurde eine 1:250 fache Verdünnung gewählt. Lysate und affinitätsgereinigte GST-Sialidase aus den genannten Schüttelkolbenansätzen wurden auf 8-25 % SDS-Gradientengelen aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe 2.7.5). Die im Gel verbliebenen Proteine wurden mit Coomassie Blue angefärbt (siehe Abbildung 46, Abbildung 47 und Abbildung 48).

Das Präimmunserum zeigt zwar im Immunoblot eine schwache, unspezifische Bindung mit Proteinen der Lysate (Abbildung 46 B, a-c), aber keine Reaktion mit der affinitätsgereinigten GST und der GST-Sialidase (Abbildung 46 B, d und e).

Im Gegensatz dazu sind im Immunoblot des Immunserum der Erstimmunisierung die spezifische Banden gegen affinitätsgereinigte GST-Sialidase (Abbildung 47 B, e) und GST (Abbildung 47 B, d) intensiv gefärbt. Im Isolat aus Klon pGEX-2T-S1 wird nicht nur die GST-Sialidase mit einem Molekulargewicht von 68 kDa erkannt, sondern zusätzlich noch zwei Proteine bei ca. 30 kDa und bei ca. 45 kDa, bei denen es sich um unvollständig translatierte Fusionsproteine handeln könnte. Das Lysat aus den untransformierten *E. coli* M15 pREP4 Zellen (Abbildung 47 B, a) zeigt im Immunoblot keine Reaktion verglichen mit den Lysaten der transformierten Zellen (Abbildung 47 B, b und c).

Das Immunserum nach Zweitimmunisierung reagierte ebenfalls spezifisch mit der affinitätsgereinigten GST (Abbildung 48 B, a) und der GST-Sialidase (Abbildung 48 B, b). Um herauszufinden, ob das Antiserum auch gegen den Sialidaseanteil des Fusionsproteins gerichtet ist, wurde affinitätsgereinigte GST-Sialidase mit Thrombin verdaut (siehe 2.8.2.4) und die Spezifität des Antiserums gegen die Fragmente im Immunoblot getestet (siehe Abbildung 48, c). Im Thrombinverdau der affinitätsgereinigten GST-Sialidase (Abbildung 48 B, c) wurden mehrere Proteolyseprodukte des GST-Sialidase Fusionsproteins mit dem Immunserum der Zweitimmunisierung detektiert. Da die GST keine Thrombinschnittstellen besitzt, müssen Fragmente mit einem Molekulargewicht unter 26 kDa vom Sialidaseanteil des Fusionsproteins stammen. Damit wurde nachgewiesen, daß das Serum Antikörper enthält, die gegen die Sialidase gerichtet sind.

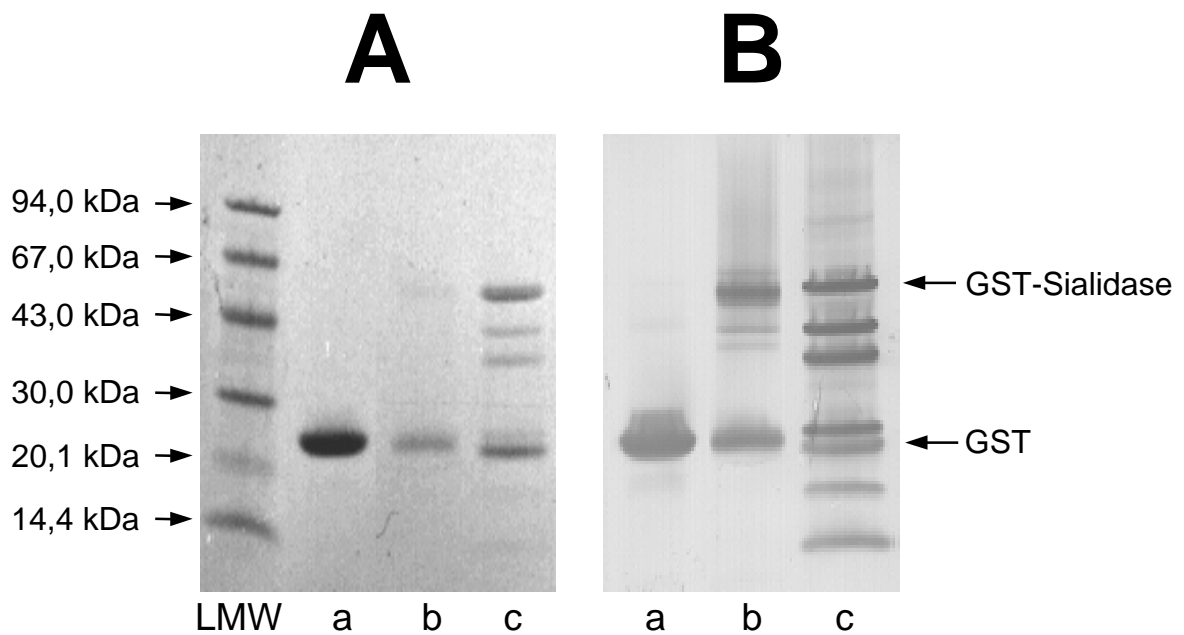


Abbildung 48: SDS-Page (A) und Immunoblot des Immunserums der Zweitimmunisierung (1:250) (B). Affinitätsgereinigte GST (a) und GST-Sialidase (b) und Thrombinverdau der affinitätsgereinigten GST-Sialidase (c). LMW, 14-94 kDa. Die Proteine wurden in einem 8-25 % SDS-Gradientengel aufgetrennt und im Immunoblot detektiert. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie Blue gefärbt.

3.7.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach Aufkonzentrierung und Umpufferung der vereinigten Fraktionen der Gelfiltration standen 328 µg hochreine GST-Sialidase zur Erstimmunisierung der Hühner zur Verfügung. Pro Huhn wurden 164 µg GST-Sialidase eingesetzt. Für die Zweitimmunisierung konnten 573 µg affinitätsgereinigte Sialidase aufkonzentriert und zur Nachimmunisierung eines Huhns eingesetzt werden.

Die Versuche zeigten, daß eine einmalige Immunisierung für die Bildung von Anti-GST-Sialidase Antikörpern ausreichend ist, da bereits mit dem Immunserum der Erstimmunisierung die GST-Sialidase nachgewiesen werden konnte. Sowohl der GST- als auch der Sialidaseanteil des Fusionsproteins wurden erkannt. Eine Kreuzreaktion mit Proteinen aus den *E. coli* M15 pREP4 Zellen fand nicht statt. Durch Nachimmunisierung mit affinitätsgereinigter GST-Sialidase ergaben sich keine zusätzlichen Banden im Immunoblot, d.h. daß die Immunseren der Erstimmunisierung

und der Zweitimmunisierung identische Spezifitäten besitzen. Demnach liegt die GST-Sialidase bereits nach der Affinitätsaufreinigung in ausreichender Reinheit vor und läßt sich zur Immunisierung einsetzen. Es wurden Immunseren mit Anti-GST-Sialidase Antikörpern hergestellt, die spezifisch mit der GST-Sialidase reagieren.

4 Zusammenfassung

In Produktionsprozessen mit CHO-Zellen wird bei hohen Zelldichten durch Zellyse cytosolische Sialidase freigesetzt. Bei der cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen handelt es sich um ein Enzym, das humane, rekombinante Glykoproteine, die in CHO-Zellen produziert werden, postsekretorisch desialylieren kann. Die terminalen Sialinsäuren N-glykosidisch gebundener Oligosaccharidketten an Glykoproteinen werden dabei abgespalten. Für Glykoproteine zum Einsatz in der Humantherapie ist die korrekte Sialylierung dieser Oligosaccharidketten relevant für die Verweildauer der Proteine im Blutkreislauf. Desialylierte Glykoproteine binden an Rezeptoren der Leber und werden abgebaut. Dadurch ist die biologische Halbwertszeit dieser Glykoproteine im Vergleich zu den vollständig sialylierten deutlich herabgesetzt. In Geweben und in Zellkulturüberständen ist die cytosolische Sialidase nur in geringen Konzentrationen vorhanden, so daß durch biochemische Aufreinigungsmethoden bisher lediglich Sialidasemengen im Mikrogrammbereich isoliert werden konnten.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Klonierung und Expression der cytosolischen Sialidase aus mittels molekularbiologischer Methoden in *E. coli*, und zwar in Form eines löslichen und aktiven Fusionsproteins. Die nachfolgende Produktion im 25 Liter Maßstab ermöglichte die Isolierung des Sialidase-Fusionsproteins im Milligrammbereich. Abschließend wurden die Sialidaseaktivität und -spezifität des produzierten Enzyms charakterisiert und ein polyklonales Antiserum gegen das Sialidase-Fusionsprotein hergestellt.

Amplifikation der Sialidase cDNA mittels RT PCR. Sialidase cDNA konnte durch den Einsatz von degenerierten Primern mittels RT PCR amplifiziert werden. Als Donatoren für die RNA wurden verschiedene CHO-Zelllinien (CHO K1, CHO SS3 A2 und CHO HCII Klon 6) eingesetzt. Auf der Grundlage der publizierten Sialidase cDNA Sequenz wurden Primer konstruiert, mit denen neue Restriktionsschnittstellen an den Enden der gebildeten RT PCR-Produkte eingefügt wurden. Alle drei verwendeten CHO-Zelllinien lieferten identische RT PCR-Produkte. Die optimale Annealingtemperatur wurde ermittelt und die Sialidase cDNA mit Ampli Taq Polymerase und mit Synergy

Polymerase amplifiziert. Durch den Einsatz der degenerierten Primer wurden Sialidase cDNA RT PCR-Produkte mit verschiedenen Schnittstellen zur Klonierung synthetisiert.

Subklonierung der amplifizierten Sialidase cDNA in pCR 2.1 Vektoren. Die RT PCR-Produkte, die an den Enden jeweils mit unterschiedlichen Schnittstellen versehen waren, wurden in pCR 2.1 Vektoren subkloniert. Zur Transformation wurden *E. coli* Inf α F⁻ Zellen eingesetzt. Die Subklonierung wurde aus zwei Gründen durchgeführt. Erstens wurde das Sialidase-Insert durch die Klonierung in den Vektor vor dem Verdau durch Exonukleasen geschützt und zweitens wurde die inserierte Sialidase cDNA mit den Vektoren in den Zellen repliziert und war so jederzeit in größeren Mengen verfügbar. Folgende RT PCR-Produkte wurden in die pCR 2.1 Vektoren kloniert.

Tabelle 40: RT PCR-Produkte der verschiedenen Primerpaare und pCR 2.1 Vektoren mit Sialidase cDNA.

RT PCR Produkt (Sialidase cDNA)	1136 bp	1148 bp	1158 bp
Primerpaar (sense / antisense)	CHOSIAL 01 / CHOSIAL 12	CHOSIAL 41 / CHOSIAL 42	CHOSIAL 51 / CHOSIAL 52
flankierende Restriktionsschnittstellen	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	<i>Bgl</i> II / <i>Bgl</i> II	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI
Plasmid (pCR 2.1 + Sialidase cDNA)	pMBU1-02 pMBU1-10	pMBU3-06 pMBU3-09	pMBU9-02

Aus dem Plasmid pMBU1-02 wurde das *Bam*HI-*Hind*III Sialidase cDNA-Fragment, aus pMBU3-09 das *Bgl*II-*Bgl*II-Fragment und aus pMBU6-02 das *Bam*HI-*Eco*RI-Fragment pGEX-2T isoliert.

Klonierung der Sialidase cDNA-Fragmente in Expressionsvektoren. Zur Produktion eines Sialidase-Fusionsproteins wurden verschiedene pQE Expressionsvektoren und ein

pGEX Expressionsvektor ausgewählt. pQE-Vektoren tragen die Information für sechs aneinanderhängende Histidinreste (6xHis-tag). Fusionsproteine mit 6xHis-tag können durch Bindung an Ni-NTA-Agarose isoliert werden. Der pGEX Expressionsvektor codiert für eine Glutathion S-Transferase, die mit dem Zielprotein fusioniert wird. Das resultierende Fusionsprotein kann mittels Glutathion Sepharose Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

Die Expressionsvektoren pQE16, pQE60, pQE31 und pGEX-2T wurden zur Klonierung der Sialidase cDNA eingesetzt. Nach Insertion der Sialidase cDNA kodieren die Expressionsvektoren pQE16 und pQE60 für ein Sialidase-Fusionsprotein, daß einen C-terminalen Polyhistidinrest trägt. Der pQE31 mit Sialidase cDNA-Insert codiert für ein Fusionsprotein mit N-terminalem Polyhistidin-Anteil. Der pGEX Expressionsvektor codiert für eine Glutathion S-Transferase, die N-terminal an die Sialidase gehängt wird.

Die aus den pCR 2.1 Vektoren isolierten Sialidase cDNA-Fragmente wurden in die Expressionsvektoren kloniert. Das *Bgl*III-*Bgl*III-Fragment wurde in die Expressionsvektoren pQE16 und pQE60 kloniert und jeweils 50 Klone überprüft. Das Sialidase-Insert konnte in keinem Klon nachgewiesen werden.

Die Klonierung des *Bam*HI-*Hind*III-Fragments in den Expressionsvektor pQE31 war dagegen erfolgreich. In 5 von 17 Klonen konnte die Sialidase cDNA nachgewiesen werden. Die Plasmide pQE31-E-04, pQE31-E-05, pQE31-E-10, pQE31-E-14 und pQE31-E-15 enthielten das Sialidase-Insert.

Auch die Klonierung des *Bam*HI-*Eco*RI-Fragments in den Expressionsvektor pGEX-2T war erfolgreich. Aus 6 von 20 untersuchten Klonen konnten Plasmide mit Sialidase cDNA isoliert werden. Das Sialidase-Insert war in den Plasmiden pGEX-2T-S1, pGEX-2T-S2, pGEX-2T-S6, pGEX-2T-S8, pGEX-2T-S17 und pGEX-2T-S19 vorhanden.

Expression des Sialidase-Fusionsproteins. Die Expression der Sialidase-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG zu den Kulturansätzen der Klone mit pQE31 Vektor und mit pGEX-2T Vektor, in denen das Sialidase-Insert nachgewiesen werden konnte, induziert. Die Promotoren der Expressionsvektoren sind für eine Überproduktion ausgelegt, so daß exprimierte Proteine in der Regel schon in SDS-PAGE Auftrennungen von Gesamtproteinextrakten der Klone identifiziert werden können. Durch SDS-PAGE Auftrennung der Proteine nach Affinitätsaufreinigung

mittels Ni-NTA-Agarose bzw. Glutathion Sepharose 4B können die 6xHis-tag-Fusionsproteine bzw. die Glutathion S-Transferase-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die Sialidaseaktivität gegenüber MUF-Neu5Ac in Lysaten der Klone wurde ermittelt.

Die Klone mit dem Expressionsvektor pQE31, die Sialidase cDNA enthielten, exprimierten kein aktives, lösliches 6xHis-tag-Sialidase Fusionsproteins. Weder in den Gesamtproteinextrakten der Klone noch in Isolaten nach Ni-NTA-Aufreinigung wurde ein Protein der entsprechenden Größe gefunden. In den Lysaten der Klone war keine Sialidaseaktivität detektierbar.

Dagegen war die Expression eines GST-Sialidase Fusionsproteins mit dem pGEX-2T Expressionsvektor erfolgreich. Die Expression der GST-Sialidase konnte in Gesamtproteinextrakten der Klone pGEX-2T-S1 und pGEX-2T-S2, die den Expressionsvektor pGEX-2T mit dem Sialidase-Insert enthielten, nachgewiesen werden. Die exprimierte GST-Sialidase wurde mit Glutathion Sepharose isoliert und die Sialidaseaktivität in den Lysaten der Klone nachgewiesen. Auch das Lysat einer nicht-induzierten Kultur des Klons pGEX-2T-S1 zeigte Sialidaseaktivität, was auf eine unvollständige Repression des Promotors schließen läßt.

Der Klon pGEX-2T-S1 wurde zur Herstellung der GST-Sialidase ausgewählt, da in den Lysates dieses Klons eine höhere Sialidaseaktivität gemessen wurde als in den Lysaten des Klons pGEX-2T-S2.

Optimierung der Induktionsbedingungen. Die Auswahl der Induktionsparameter (Induktionstemperatur, Induktionsdauer, IPTG-Konzentration und Zelldichte bei Induktionsstart) bestimmt die Ausbeute an löslicher, aktiver GST-Sialidase. Veränderte Induktionsparameter beeinflussen die Bildung von Einschlußkörpern (inclusion bodies), die Menge an unvollständig gebildetem Fusionsprotein und den proteolytischen Verdau rekombinanter Proteine in den *E. coli* Zellen. Um zu untersuchen, welche der Induktionsparameter optimal für die Produktion der GST-Sialidase sind, wurden Ansätze des Klons pGEX-2T-S1 unter verschiedenen Bedingungen induziert.

Induktionstemperatur: Zunächst wurde die Induktionstemperatur von 37°C auf 25°C gesenkt und die Sialidaseaktivität der bakteriellen Lysate gegenüber MUF-Neu5Ac

verglichen. Die Sialidaseaktivität in den Lysaten konnte durch eine Temperaturerniedrigung von 37°C auf 25°C um den Faktor 15 gesteigert werden.

Induktionsdauer: Nach der Untersuchung des Einflusses der Temperaturverringerung wurde die Auswirkung der Verlängerung der Induktionsdauer getestet. Dazu wurde dem Kultivierungsansatz jeweils nach 1, 2, 3, und 4 h Induktionsdauer Zellsuspension entnommen und die GST-Sialidase mittels Glutathion Sepharose aufgereinigt und mittels SDS-PAGE untersucht. Nach einer Induktionsdauer von nur einer Stunde wurde die GST-Sialidase im Gel nachgewiesen. Die Verlängerung auf 2 h Induktionszeit führte zu einer intensiveren GST-Sialidasebande im Gel. Die weitere Verlängerung der Induktionsdauer von 2 auf 4 h bewirkte keine weitere Veränderung der GST-Sialidasebande. Mit steigender Induktionsdauer wurde im Gel eine schwache, diffuse Proteinbande bei ca. 30 kDa detektiert. Da diese Bande in Isolaten aus dem nicht-induzierten Klon nicht vorhanden ist, handelt es sich entweder um unvollständig gebildete GST-Sialidase oder um Proteolyseprodukte, die bei einem möglichen Verdau des intrazellulär akkumulierten Fusionsproteins in *E. coli* entstehen.

IPTG-Induktion: Als nächstes wurden die Sialidaseaktivitäten der Lysate und die Ausbeute an affinitätschromatographisch gereinigter GST-Sialidase nach der Induktion mit 0,1, 0,5 und 1 mM IPTG miteinander verglichen. Im Vergleich zur Induktion bei unterschiedlichen Temperaturen wurde die Sialidaseaktivität im Lysat durch den Einsatz verschiedener IPTG-Konzentrationen nur geringfügig verändert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurde die höchste Sialidaseaktivität im Lysat gemessen. Bei Einsatz von 0,5 mM IPTG wurden 82 % und bei 0,1 mM 70 % der maximalen Sialidaseaktivität gemessen. Auch die Ausbeute war nach Induktion mit 1 mM IPTG geringfügig höher als bei den beiden niedrigeren Konzentrationen.

Zelldichte bei Induktionsstart: Abschließend wurde untersucht, ob die Zelldichte, bei der die Induktion erfolgt, einen Effekt auf die Produktausbeute hat. Nach Induktionsstart bei Zelldichten von (OD_{600}) von 0,4, 0,68 und 1,05 wurden die Sialidaseaktivitäten in den Lysaten und in den affinitätsgereinigten Isolaten ermittelt. Die IPTG-Zugabe bei einer OD_{600} von 0,68 führte zur höchsten gemessenen Sialidaseaktivität im Lysat. Nach Induktion bei einer OD_{600} von 0,4 und bei einer OD_{600} von 1,05 wurden jeweils 97 % und 85 % der maximalen Sialidaseaktivität erreicht. Die IPTG-Zugabe bei den genannten Zelldichten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sialidaseaktivitäten der Isolate.

Die Erniedrigung der Induktionstemperatur hatte den größten Effekt auf die Expression der GST-Sialidase. Die Veränderung der anderen getesteten Induktionsparameter hatte dagegen kaum einen Effekt auf die Expression des Fusionsproteins. Zur Produktion der GST-Sialidase wurde für alle weiteren Ansätze eine Induktionstemperatur von 25°C gewählt.

Maßstabsvergrößerung der Kultivierung von 250 ml auf 25 Liter. Zur Maßstabsvergrößerung der Kultivierung des Klons pGEX-2T-S1 wurden Wachstumskurven von 250 ml Schüttelkolbenansätzen und von zwei Fermentationen im 25 Litermaßstab aufgenommen. Alle Ansätze zeigten einen ähnlichen Kulturverlauf. Nach der Initialphase stieg die Zelldichte bis zur Induktion exponentiell an. Nach Induktionsstart und Temperaturshift von 37°C auf 25°C verringerte sich die Wachstumsgeschwindigkeit. Bei einer Induktionsdauer von 150 min wurde in den Schüttelkolbenansätzen eine OD₆₀₀ zwischen 2,7 und 2,9 erreicht, während in Fermentation 1 nach 190 min eine OD₆₀₀ von 3,2 und in Fermentation 2 nach 155 min eine OD₆₀₀ von 4,3 vorlag. Die Wachstumskurven aus Schüttelkolbenansätzen und aus den Fermentationen zeigten tendentiell gleiche Verläufe. Die Maßstabsvergrößerung von 250 ml auf 25 Liter wurde erfolgreich durchgeführt.

Aufreinigung der GST-Sialidase mittels Glutathion Sepharose Affinitätschromatographie. Zunächst wurden Vorversuche zur Aufreinigung der GST-Sialidase mittels Glutathion Sepharose Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurde die GST-Sialidase aus einem 250 ml Schüttelkolbenansatz und aus zwei 1 Liter Produktionsansätzen aufgereinigt. Aus dem 250 ml Schüttelkolbenansatz wurden nach 2 h Induktion mit 1 mM IPTG bei 25°C 267 µg GST-Sialidase mit einer spezifischen Aktivität von 0,581 U/mg Protein isoliert. Die spezifische Aktivität wurde um das 45 fache angereichert. 38 % der Ausgangs-Sialidaseaktivität konnte nach der Aufreinigung nachgewiesen werden.

Um die Abreicherung der Proteine aus dem Lysat zu dokumentieren, wurde ein 1 Liter Produktionsansatz mit einer 2 ml Glutathion Sepharose Säule aufgereinigt. Das Lysat, der Säulendurchlauf und die Eluat-Fraktionen 2 bis 5 wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Hauptanteil des Fusionsproteins eluiert in der 3. Fraktion, und nach

Elution mit dem 5 fachen Säulenvolumen ist das Sialidase-Fusionsprotein vollständig eluiert.

Bei der Durchführung einer zweiten Affinitätsreinigung eines 1 Liter Produktionsansatzes mit einer 4 ml Glutathion Sepharose Säule wurde das Elutionsprofil aufgenommen und zu den Fraktionen mit Sialidaseaktivität in Bezug gesetzt. Die Sialidaseaktivität der Fraktionen 3 bis 7 korreliert mit dem aufgenommenen UV-Signal, das proportional zur Proteinkonzentration ist.

Nach diesen Vorversuchen wurde die GST-Sialidase aus 25 Liter Ansätzen im Bioreaktor (Fermentation 1 und Fermentation 2) produziert und aufgereinigt. Aus 25 Liter Kulturvolumen der Fermentation 1 wurden nach 2 h 30 min Induktion mit 0,1 mM IPTG bei 25°C 26,46 mg mit einer spezifischen Aktivität von 0,999 U / mg Protein aufgereinigt. Eine 40 fache Anreicherung der spezifischen Aktivität wurde erreicht und die Ausbeute betrug 23,3 % der Sialidaseaktivität im Ausgangslysat.

Mittels Immunoblot mit einem Anti-GST Antikörper wurde der GST-Anteil des produzierten Sialidase-Fusionsproteins spezifisch nachgewiesen. Neben dem Hauptprotein wurden keine Proteinkontaminationen im SDS-Gel nachgewiesen.

Aus Fermentation 2 konnten nach 3 h 10 min Induktion mit 1 mM IPTG bei 25°C 13,8 mg Protein mit einer spezifischen Aktivität von 0,891 U / mg Protein aufgereinigt werden. Mit einer Ausbeute von 68 % Sialidaseaktivität war die Affinitätschromatographie deutlich effektiver als bei Fermentation 1 und den Schüttelkolbenkulturen, bei denen die Ausbeuten 20-30 % betrugen. Die spezifische Aktivität konnte um das 178,2 fache angereichert werden. In Fermentation 2 war die spezifische Aktivität, also der Anteil produzierter GST-Sialidase am Gesamtproteingehalt, mit 0,005 U / mg Protein erheblich geringer als in Fermentation 1 mit 0,025 U / mg Protein.

Aufgrund der Voruntersuchungen zur Optimierung der Induktionsparameter kann ausgeschlossen werden, daß die verschiedenen Induktionsbedingungen der Fermentationen zu solch unterschiedlichen Ergebnissen führen. Es müssen daher noch andere, nicht näher untersuchte Parameter einen Einfluß auf die Produktion der GST-Sialidase haben. Die Unterschiede könnten z.B. darauf zurückzuführen sein, daß in Fermentation 2 eine Glycerinkultur des Klons pGEX-2T-S1 und keine frisch transformierten Zellen eingesetzt wurden. Es wurde bereits beschrieben, daß der Einsatz

von Glycerinkulturen an Stelle von frisch transformierten Zellen zu einer verringerten Expression führen kann.

Es wurden mittels Glutathion Sepharose Affinitätschromatographie 26,46 mg lösliche und aktive GST-Sialidase aus Fermentation 1 und 13,8 mg aus Fermentation 2 aufgereinigt.

Feinreinigung der GST-Sialidase. Die affinitätsgereinigte GST-Sialidase aus Fermentation 1 wurde mittels Q Sepharose FF Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration nachgereinigt, um hochreines Produkt zur Immunisierung herzustellen. Mittels Ionenaustauschchromatographie konnten aus 26,46 mg affinitätschromatographisch gereinigter GST-Sialidase 4,43 mg Enzym aufgereinigt werden. Die spezifische Sialidaseaktivität konnte nicht angereichert werden und die Ausbeute betrug nur 16,7 %. Bei der Ionenaustauschchromatographie ging ein Teil der Sialidaseaktivität verloren, ohne daß die spezifische Aktivität dadurch angereichert werden konnte. Mittels Gelfiltration wurden aus den GST-Sialidase-enthaltenden Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie 770 µg hochreine GST-Sialidase aufgereinigt. Die spezifische Aktivität wurde dabei um das 3,5 fache angereichert. 60 % der in den Ionenaustauschchromatographie-Fractionen vorhandenen Aktivität wurden in den vereinigten Gelfiltrations-Fractionen nachgewiesen. Durch die Untersuchung der einzelnen Fraktionen der Gelfiltration konnte die Aggregatbildung des GST-Sialidase Fusionsproteins bestätigt werden. Die hochreine GST-Sialidase wurde zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt.

Charakterisierung der GST-Sialidaseaktivität. Die Enzymaktivität der affinitätsgereinigten Sialidase aus Fermentation 2 wurde biochemisch mit Hilfe der Inhibitoren Neu5Ac und Neu5Ac2en untersucht. Beide Inhibitoren sind in der Lage, die Sialidaseaktivität des Fusionsproteins zu hemmen, wobei die Inhibition der GST-Sialidase durch Neu5Ac einer Endprodukthemmung entspricht. Durch 2 mM Neu5Ac wurde die Aktivität von 0,203 mU GST-Sialidase um ca. 20 % reduziert.

Bei einer Konzentration von 0,5 mM Neu5Ac2en konnte eine Verringerung der Aktivität von 0,203 mU GST-Sialidase um ca. 75 % gemessen werden. Neu5Ac2en hemmt die Sialidaseaktivität sehr viel effektiver als Neu5Ac. Inhibitorkonzentrationen von 0,1 mM Neu5Ac2en sind bereits ausreichend, um die Aktivität um ca. 50 % zu

reduzieren. Diese Daten stimmen mit veröffentlichten Untersuchungen der cytosolischen Ratten-Sialidase überein, wonach sowohl Neu5Ac als auch Neu5Ac2en die Aktivität der cytosolischen Sialidase aus Rattenleber hemmen, Neu5Ac2en aber um ein Vielfaches effektiver inhibiert.

Charakterisierung der Sialidasespezifität. Die Spezifität der affinitätsgereinigten GST-Sialidase aus Fermentation 2 wurde mit Hilfe von Gangliosiden aus humanen Granulozyten untersucht. Granulozyten Ganglioside besitzen Lipid-gebundene terminal sialylierte Neolacto-Typ II-Oligosaccharid-Sequenzen, die auch Protein-gebunden in Glykoproteinen vorkommen. Die Spezifitäten von *V. cholerae* Neuraminidase und der GST-Sialidase gegenüber den Substraten wurden miteinander verglichen. Bei einer Aktivität von 3,2 mU / ml Enzym konnten die korrespondierenden Asialoganglioside der Neolactoserie-Ganglioside IV³- α -Neu5Ac-nLc₄Cer, IV⁶- α -Neu5Ac-nLc₄Cer und VI³- α -Neu5Ac-nLc₆Cer bei beiden Enzymen nachgewiesen werden, d.h. beide Enzyme sind in der Lage, sowohl α (2,3)- als auch α (2,6)-sialylierte Neolactoserie-Ganglioside zu hydrolysieren. Wurden nur 0,8 mU/ml Enzym eingesetzt, zeigte die GST-Sialidase im Gegensatz zur *V. cholerae* Neuraminidase eine deutliche Präferenz gegenüber α (2,3)-sialylierten Neolactoserie-Gangliosiden. Im Hinblick auf die Desialylierung von Glykoproteinen läßt sich daraus schließen, daß die GST-Sialidase sowohl α (2,3)- als auch α (2,6)-sialysierte Oligosaccharidketten an Glykoproteinen desialylieren kann, wobei bevorzugt α (2,3)-gebundene terminale Sialinsäuren abgespalten werden.

Herstellung polyklonaler Antikörper gegen GST-Sialidase. Hochreine GST-Sialidase aus der Feinreinigung wurde als Antigen eingesetzt, um in Hühnern polyklonale Antikörper herzustellen. Es wurde durch Erstimmunisierung mit der hochreinen GST-Sialidase und Nachimmunisierung mit affinitätsgereinigtem GST-Sialidase Fusionsprotein ein Immunserum hergestellt, das spezifisch mit der GST-Sialidase reagiert. Eine Kreuzreaktion mit Proteinen aus den *E. coli* M15 pREP4 Zellen fand nicht statt. Die Versuche zeigten, daß sich das hergestellte Immunserum für den spezifischen Nachweis der GST-Sialidase einsetzen läßt.

μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
d	Tag
E	Extinktion
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar, mol l^{-1}
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
Nl	Normliter
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
pg	Picogramm
sec	Sekunden
U	Unit, $\mu\text{mol min}^{-1}$
U	Umdrehung
V	Volt

5 Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AL	Alkalische Lyse
<i>amp^r</i>	Ampicillinresistenzgen
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection (engl.)
AT III, rh AT III	Antithrombin III, rekombinantes humanes Antithrombin III
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
<i>bla</i>	Ampicillinresistenzgen
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine serum albumin (engl.)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa (lat.)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
<i>cat</i>	Chloramphenicolresistenzgen
CBP	Calmodulin binding protein (engl.)
CPMP	Committee for Proprietary Medical Productions (engl.)
CHO	Chinese hamster ovary (engl.)
Cl	Chlor
CO ₂	Kohlendioxid
CuSO ₄	Kupfersulfat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (engl.)
DNA	Desoxyribonucleic acid (engl.)
cDNA	complementary DNA (engl.)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay (engl.)
EMB	Eosin-Methylenblau
EPO, rh EPO	Erythropoietin, rekombinantes humanes Erythropoietin
EtBr	Ethidiumbromid
et al.	et aliis (lat.)
FCA	Freund's complete adjuvant (engl.)
FCS	Fetal calf serum (engl.)
FDA	Food and Drug Administration (engl.)
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose

GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GP63	Leishmanolysin
GPI	Glykosyl Phosphatidylinositol
GSL	Glykosphingolipide
GST	Glutathion S-Transferase
GuSCN	Guanidiniumthiocyanat
H	Wasserstoff
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HC II, rh HC II	Heparin Cofaktor II, rekombinanter humaner Heparin Cofaktor II
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HPTLC	High performance thin-layer chromatography (engl.)
Ig	Immunglobulin
INF, rh INF	Interferon, rekombinantes humanes Interferon
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ISB	Informations Sekretariat Biotechnologie
<i>kan^r</i>	Kanamycinresistenzgen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
<i>lac</i>	Laktosepromotor
<i>lacIq</i>	Repressorgen des Lactoseoperons
<i>lacZα</i>	Gen für β-Galaktosidase
LB	Lennox Broth (engl.)
LMW	Low molecular weight (engl.)
Man	Mannose
MBP	Maltose binding protein (engl.)
mcs	Multiple cloning site (engl.)
MEM	Modified Eagle's Medium (engl.)
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
MUF	Methylumbelliferon
MuLV	muriner Leukämievirus
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HCO ₃	Dinatriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitro Blue Tetrazolium (engl.)
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Ac2en	2-Deoxy-2,3-Dehydro-N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolylnneuraminsäure
NTA	Nitrilotriacetic acid (engl.)
NTP	Nucleosidtriphosphat (Nucleotid)
O	Sauerstoff

<i>ori</i>	Origin of replication (engl.)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAO	Phenylarsenoxid
PBS	Phosphate buffered saline (engl.)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
PolyA	Polyadenin
P _{tag}	modifizierter Lactosepromotor
Q	quarternäres Ammonium
RNA, mRNA	Ribonucleic acid (engl.), messenger ribonucleic acid
RT	Reverse Transkriptase
RT PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction (engl.)
S	Schwefel
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase (engl.)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
Sf9	Zelllinie aus Raupen der Schmetterlings <i>Spodoptera frugiperda</i>
SFP	Specific pathogen free (engl.)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>tag</i>	modifizierter Lactosepromotor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TFB	Transformation buffer (engl.)
TCA	Trichloressigsäure
Thr	Threonin
tPA, rh tPA	Tissue Plasminogen Activator (engl.), rekombinanter humaner Tissue Plasminogen Activator
<i>trp</i>	Tryptophanpromotor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Thyroid stimulating hormone
TYM	Trypton Yeast Medium (engl.)
US	United States (engl.)
USA	United States of America (engl.)
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid

6 Literaturverzeichnis

Akita, H., Miyagi, T., Hata, K., Kagayama, M. (1997)

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF RAT CYTOSOLIC SIALIDASE IN RAT SKELETAL MUSCLES.

Histochem. Cell Biol., **107**, 495-503

Ashwell, G., Harford, J. (1982)

CARBOHYDRATE-SPECIFIC RECEPTORS OF THE LIVER.

Annu. Rev. Biochem., **51**, 531-54

Barnes, D., Sato, G. (1980)

METHODS FOR GROWTH OF CULTURED CELLS IN SERUM-FREE MEDIUM.

Anal. Biochem., **102**, 255-270

Barnes, W. M. (1992)

THE FIDELITY OF TAQ POLYMERASE CATALYSING PCR IS IMPROVED BY AN N-TERMINAL DELETION.

Gene, **112**, 29-35

Barnes, W. M. (1994)

PCR AMPLIFICATION OF UP TO 35-KB DNA WITH HIGH FIDELITY AND HIGH YIELD FROM λ BACTERIOPHAGE TEMPLATES.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 2216-2220

Berman, P. W., Lasky, L. A. (1985)

ENGINEERING GLYCOPROTEINS FOR USE AS PHARMACEUTICALS.

Trends Biotechnol., **3**, 51-53

BIO RAD

Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit Instruction Manual

4100066 Rev B

Bradford, M. (1976)

A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING.

Anal. Biochem., **72**, 248-254

Briggs, D. W., Fisher, J. W., George, W. J. (1974)

HEPATIC CLEARANCE OF INTACT AND DESIALYLATED ERYTHROPOIETIN.

American J. Physiol., **227**, 1385-1388

Cline, J., Braman, J. C., Hogrefe, H. H. (1996)

PCR FIDELITY OF PFU DNA POLYMERASE AND OTHER THERMOSTABLE DNA POLYMERASES.

Nucleic Acids Res., **24** (18), 3546-3551

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987)

SINGLE-STEP METHOD OF RNA ISOLATION BY ACID GUANIDINIUM THIOCYANATE-PHENOL-CHLOROFORM EXTRACTION.

Anal. Biochem., **162** (1), 156-159

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972)

NONCHROMOSOMAL ANTIBIOTIC RESISTANCE IN BACTERIA: GENETIC TRANSFORMATION OF *E. COLI* BY R-FACTOR DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 2110-2114

Cumming, D. A. (1991)

GLYCOSYLATION OF RECOMBINANT PROTEIN THERAPEUTICS: CONTROL AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS.

Glycobiology, **1**, 115-30

Darrell, T-Y. L. (1992)

GLYCOPROTEIN PHARMACEUTICALS: SCIENTIFIC AND REGULATORY CONSIDERATIONS, AND THE US ORPHAN DRUG ACT.

Trends Biochem. Sci., **10**, 114-20

Dulbecco, R., Freeman, G. (1959)

PLAQUE PRODUCTION BY THE POLYOMA VIRUS.

Virology, **8**, 396-397

Dwek, R. A., Edge, C. J., Harvey D. J., Wormald M. R. (1993)

ANALYSIS OF GLYCOPROTEIN-ASSOCIATED OLIGOSACCHARIDES.

Annu. Rev. Biochem., **62**, 65-100

Feizi, T., Childs, R. A. (1987)

CARBOHYDRATES AS ANTIGENIC DETERMINANTS OF GLYCOPROTEINS.

Biochem. J., **245**, 1-11

Ferrari, J., Harris R., Warner, T.G. (1994)

CLONING AND EXPRESSION OF A SOLUBLE SIALIDASE FROM CHINESE HAMSTER OVARY CELLS: SEQUENCE ALIGNMENT SIMILARITIES TO BACTERIAL SIALIDASES.

Glycobiology **4**, 367-373

Ferrari, J., Gunson, J., Lofgren, J., Krummen, L., Warner, T. G. (1998)

CHINESE HAMSTER OVARY CELLS WITH CONSTITUTIVELY EXPRESSED SIALIDASE ANTISENSE RNA PRODUCE RECOMBINANT DNASE IN BATCH CULTURE WITH INCREASED SIALIC ACID.

Biotechnol. Bioeng., **60**, 589-595

Georgiou, G. und Valax, P. (1996)

EXPRESSION OF CORRECTLY FOLDED PROTEINS IN *ESCHERICHIA COLI*.

Curr. Opin. Biotechnol., **7**, 190-197

Geisow, M. J. (1992)

GLYCOPROTEIN GLYCANS-ROLE AND CONTROLS.

Trends Biotechnol., **10**, 333-335

Glick, B. R., Pasternak, J. J. (1995a)

MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE,

Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Kap. 4, 91

Glick, B. R., Pasternak, J. J. (1995b)

MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE

Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Kap. 4.4, 104-105

Goda, S. K. und Minton, N. P. (1995)

A SIMPLE PROCEDURE FOR GEL ELECTROPHORESIS AND NORTHERN BLOTTING OF RNA.

Nucleic Acids Res., **23**, 3357-3358

Gramer, J. M., Goochie, C. F. (1993a)

GLYCOSIDASE ACTIVITIES OF THE 293 AND NS0 CELL LINES, AND OF AN ANTIBODY-PRODUCING HYBRIDOMA CELL LINE.

Biotechnol. Bioeng., **43**, 423-428

Gramer, J. M., Goochee, C. F. (1993b)

GLYCOSIDASE ACTIVITIES IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS AND CELL CULTURE SUPERNATANT.

Biotechnol. Prog., **9**, 366-73

Gramer, J. M., Goochee, C. F., Chock, V. Y., Brousseau, D. T., Sliwowski, M. B. (1995)

REMOVAL OF SIALIC ACID FROM A GLYCOPROTEIN IN CHO CELL CULTURE SUPERNATANT BY ACTION OF AN EXTRACELLULAR CHO CELL SIALIDASE.

Biotechnology, **13**, 692-98

Gu, X., Wang, D. I. C. (1997)

IMPROVEMENT OF INTERFERON- γ SIALYLATION IN CHINESE HAMSTER OVARY CELL CULTURE BY FEEDING OF N-ACETYLMANNOSAMINE.

Biotech. Bioeng., **58**, 642-48

Hanahan, D. (1983)

STUDIES ON TRANSFORMATION OF *ESCHERICHIA COLI* WITH PLASMIDS.

J. Mol. Biol., **166**, 557-580

Ham, R., G. (1965)

CLONAL GROWTH OF MAMMALIAN CELLS IN A CHEMICALLY DEFINED, SYNTHETIC MEDIUM.

Proc. Natl. Acad., Sci., USA, **53**, 288-293

Haverkamp, A. (1998)

ZELLWACHSTUMSINHIBITORISCHE EFFEKTE IN HYBRIDOMAZELLKULTIVIERUNGEN: DIE ROLLE ENDOGENER RETROVIREN.

Dissertation, Universität Bielefeld, Technische Fakultät, S. 33

Harris, R. J., Leonard, C. K., Guzzetta, A. W., Spellman, M. W. (1991)

TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR HAS AN O-LINKED FUCOSE ATTACHED TO THREONINE-61 IN THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR DOMAIN.

Biochemistry, **30**, 2311-14

Heape, A. M., Lehto, V.-P., Kursula, P. (1999)

THE EXPRESSION OF RECOMBINANT LARGE MYELIN-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN CYTOPLASMATIC DOMAIN AND THE PURIFICATION OF NATIVE MYELIN-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN FROM RAT BRAIN AND PERIPHERAL NERVE.

Prot. Expr. Purif., **15**, 349-361

Hengen, P. (1996)

PURIFICATION OF GST FUSION PROTEINS.

Trends Biochem. Sci., **21**, 400-401

Heukeshoven, J., Dernick, R. (1985)

SIMPLIFIED METHOD FOR SILVER STAINING OF PROTEINS IN POLYACRYLAMIDE GELS AND MECHANISM OF SILVER STAINING.

Electrophoresis, **6**, 103-112

Informations Sekretariat Biotechnologie (ISB) (2001)

DER WELTMARKT FÜR REKOMBINANTE THERAPEUTIKA;

Fakten und Zahlen; Zahlen aus der Biotechnologie.

<http://www.i-s-b.org/>

Janosi, J. B. M., Firth, S. M., Bond, J. J., Baxter, R. C., Delhanty, P. J. D. (1999)

N-LINKED GLYCOSYLATION AND SIALYLATION OF THE ACID-LABILE SUBUNIT. ROLE IN COMPLEX FORMATION WITH INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR (IGF)-BINDING PROTEIN-3 AND THE IGFs.

J. Biol. Chem., **274**, 5292-98

Ji, X., Zhang, P., Armstrong, R. N., Gilliland, G. L. (1992)

THE THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF A GLUTATHIONE S-TRANSFERASE FROM THE μ GENE CLASS. STRUCTURAL ANALYSIS OF THE BINARY COMPLEX OF ISOENZYME 3-3 AND GLUTATHIONE A 2.2-Å RESOLUTION.

Biochemistry, **27**, 31 (42), 10169-84

Jenkins, N., Curling, M. A. (1994)

GLYCOSYLATION OF RECOMBINANT PROTEINS: PROBLEMS AND PROSPECTS.

Enzyme Microb. Technol., **16**, 353-64

Jenkins, N., Parekh, R. B., James, D. C. (1996)

GETTING THE GLYCOSYLATION RIGHT: IMPLICATIONS FOR THE BIOTECHNOLOGY INDUSTRY.

Nature Biotechnology, **14**, 975-81

Jenkins, N. (1999)

ANIMAL CELL BIOTECHNOLOGY: METHODS AND PROTOCOLS.

Methods in Biotechnology, edit. Walker, J. M., Humana Press Inc., V

Kagawa, Y., Takasaki, S., Utsumi, J., Hosoi, K., Shimizu, H., Kochibe, N., Kobata, A. (1988)

COMPARATIVE STUDY OF THE ASPARAGINE-LINKED SUGAR CHAINS OF NATIVE HUMAN INTERFERON- β 1 AND RECOMBINANT HUMAN INTERFERON- β 1 PRODUCED BY THREE DIFFERENT MAMMALIAN CELLS.

J. Biol. Chem., **263**, 17508-15

Kao, F. T., Puck, T.T. (1968)

GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS; VII. INTRODUCTION AND ISOLATION OF NUTRITIONAL MUTANTS IN CHINESE HAMSTER CELLS.

Proc. Natl. Acad. Sci., **60**, 1275-1281

Kobata, A. (1979)

USE OF ENDO- AND EXOGLYCOSIDASES FOR STRUCTURAL STUDIES OF GLYCOCONJUGATES.

Anal. Biochem., **100**, 1-14

Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985)

ASSEMBLY OF ASPARAGINE LINKED OLIGOSACCHARIDES.

Annu. Rev. Biochem., **54**, 631-64

Koths, K. (1995)

RECOMBINANT PROTEINS FOR MEDICAL USE: THE ATTRACTIONS AND CHALLENGES.

Curr. Opin. Biotechnol., **6**, 681-87

Lee, E. U., Roth, J., Paulson, J. C. (1989)

ALTERATION OF TERMINAL GLYCOSYLATION SEQUENCES ON N-LINKED OLIGOSACCHARIDES OF CHINESE HAMSTER OVARY CELLS BY EXPRESSION OF β -GALACTOSID α 2,6-SIALYLTRANSFERASE.

J. Biol. Chem., **264**, 13848-55

Liu, D. T-Y. (1992)

GLYCOPROTEIN PHARMACEUTICALS: SCIENTIFIC AND REGULATORY CONSIDERATIONS, AND THE US ORPHAN DRUG ACT.

Trend Biotechnol., **10**, 114-20

- Maru, Y., Afar, D. E., Witte, O. N., Shibuya, M. (1996)**
THE DIMERIZATION PROPERTY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PARTIALLY REACTIVATES Bcr-Abl LACKING THE OLIGOMERIZATION DOMAIN.
J. Biol. Chem., **271**, 15353-57
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1989a)**
MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL.
Cold Spring Harbor Laboratory, 1.25-1.28
- Minch, S., Kallio, P. T., Bailey, J. E. (1995)**
TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR COEXPRESSED IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS WITH $\alpha(2,6)$ -SIALYLTRANSFERASE CONTAINS NeuAc $\alpha(2,6)$ Gal $\beta(1,4)$ Glc-N-AcR LINKAGES.
Biotechnol. Prog., **11**, 348-51
- Miyagi, T., Tsuiki, S. (1985)**
PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CYTOSOLIC SIALIDASE FROM RAT LIVER.
J. Biol. Chem., **260**, 6710-16
- Miyagi, T., Sagawa, J., Konno, K., Tsuiki, S. (1990)**
IMMUNOLOGICAL DISCRIMINATION OF INTRALYSOSOMAL, CYTOSOLIC, AND TWO MEMBRANE SIALIDASES PRESENT IN RAT TISSUES.
J. Biochem., **107**, 794-98
- Miyagi, T., Keike, H., Hasegawa, A., Aoyagi, T. (1993a)**
DIFFERENTIAL EFFECT OF VARIOUS INHIBITORS ON FOUR TYPES OF RAT SIALIDASE.
Glycoconjugate J., **10**, 45-49
- Miyagi, T., Konno, K., Kawasaki, H., Suzuki, K., Yasui, A., Tsuik, S. (1993b)**
MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF CDNA ENCODING RAT SKELETAL MUSCLE CYTOSOLIC SIALIDASE.
J. Biol. Chem., **268**, 26435-40
- Monti, E., Preti, A., Rossi, E., Ballabio, A., Borsani, G. (1999)**
CLONING AND CHARACTERIZATION OF NEU2, A HUMAN GENE HOMOLOGOUS TO RODENT SOLUBLE SIALIDASES.
Genomics, **57**, 137-43
- Moreman, K. W., Trimble, R. B., Herscovics, A. (1994)**
GLYCOSIDASES OF THE ASPARAGINE-LINKED OLIGOSACCHARIDE PROCESSING PATHWAY.
Glycobiology, **4**, 113-125
- Morrison, C. J., Easton, R. L., Morris, H. R., McMaster, W. R., Piret, J. M., Dell, A. (2000)**
MODIFICATION OF A RECOMBINANT GPI-ANCHORED METALLOPROTEINASE FOR SECRETION ALTERS THE PROTEIN GLYCOSYLATION.
Biotech. Bioeng., **68**, 407-21
- Müthing, J., Peter-Katalinić, J., Hanisch, F-G., Neumann U. (1991)**
STRUCTURAL STUDIES OF GANGLIOSIDES FROM THE YAC-1 MOUSE LYMPHOMA CELL LINE BY IMMUNOLOGICAL DETECTION AND FAST ATOM BOMBARDMENT MASS SPECTROMETRY.
Glycoconjugate J., **8**, 414-423
- Müthing, J., Unland, F., Heitmann, D., Orlich, M., Hanisch, F-G., Peter-Katalinić, J., Knäuper, V., Tschesche, H., Kelm, S., Schauer, R., Lehmann, J. (1993)**
DIFFERENT BINDING CAPACITIES OF INFLUENZA VIRUS A AND SENDAI VIRUSES TO GANGLIOSIDES FROM HUMAN GRANULOCYTES.
Glycoconjugate J., **10**, 120-126

Müthing, J., Neumann, U. (1993)

SELECTIVE DETECTION OF TERMINALLY ALPHA 2-3 AND ALPHA 2-6 SIALYLATED NEOLACTO-SERIES GANGLIOSIDES BY IMMUNOSTAINING ON THIN LAYER CHROMATOGRAMS.

Biomed. Chromatogr., **7**, 158-161

Müthing, J. (1996)

HIGH-RESOLUTION THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY OF GANGLIOSIDES.

J. Chromatogr. A **720**, 3-25

Müthing, J., Spanbroek, R., Peter-Katalinić, Hanisch, F-G., Hanski, C., Hasegawa, A., J., Unland, F., Lehmann, J., Tschesche, H., Egge, H. (1996)

ISOLATION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF FUCOSYLATED GANGLIOSIDES WITH LINEAR POLY-N-ACETYLLACTOSAMINYL CHAINS FROM HUMAN GRANULOCYTES.

Glycobiology, **6**, 147-156

Munzert, E. (1996)

PRODUKTION VON REKOMBINANTEM ANTITHROMBIN III IN SÄUGETIERZELLEN: EINFLUSS ZELLULÄRER SIALIDASE AUF DIE PRODUKTINTEGRITÄT.

Dissertation, Universität Bielefeld, Technische Fakultät

Munzert, E., Müthing, J., Büntemeyer, H., Lehmann, J. (1996)

SIALIDASE ACTIVITY IN CULTURE FLUID OF CHINESE HAMSTER OVARY CELLS DURING BATCH CULTURE AND ITS EFFECT ON RECOMBINANT HUMAN ANTITHROMBIN III INTEGRITY.

Biotechnol. Prog., **12**, 559-563

Munzert, E., Heidemann, R., Büntemeyer, H., Lehmann, J., Müthing, J. (1997)

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN ANTITHROMBIN III ON 20-L-BIOREACTOR SCALE: CORRELATION OF SUPERNATANT NEURAMINIDASE ACTIVITY, DESIALYLATION, AND DECREASE OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF RECOMBINANT PROTEIN.

Biotechnol. Bioeng., **56**, 441-447

Nerger, S. (1990)

MICROCARRIER-KULTIVIERUNG VON PRIMÄREN ENDOTHELZELLEN AUS DER RINDERAORTA.

Diplom Arbeit, Universität Bielefeld, Technische Fakultät

Parekh, R. B., Dwek, R. A., Thomas, J. R., Opdenakker, G., Rademacher, T. W. (1989)

CELL-TYPE-SPECIFIC N-GLYCOSYLATION OF TYPE I AND TYPE II HUMAN TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR.

Biochemistry, **28**, 7644-62

Parekh, R. B., Patel, T. P. (1992)

COMPARING THE GLYCOSYLATION PATTERNS OF RECOMBINANT GLYCOPROTEINS.

Trends Biotechnol., **10**, 276-80

Paulson, J. C., Weinstein, J., Schauer, A. (1989)

TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF SIALYLTRANSFERASES.

J. Biol. Chem., **264**, 10931-34

Paulson, J. C. (1989b)

GLYCOPROTEINS: WHAT ARE THE SUGAR CHAINS FOR.

Trends Biochem. Sci., **14**, 272-276

Pelle, R. und Murphy, N. B. (1993)

NORTHERN HYBRIDIZATION: RAPID AND SIMPLE ELECTROPHORETIC CONDITIONS.

Nucleic Acids Res., **21**, 2783-2784

PHASTSYSTEM APPLICATION FILE NO. 370 (1987)

RAPID ANALYSIS OF PROTEINURIA USING GRADIENT PAGE AND IEF.

Table 1

Riese, U. (1994)

ENTWICKLUNG EINER PILOTANLAGE ZUR NÄHRMEDIENREZYKLISIERUNG FÜR DIE MASSENKULTUR TIERISCHER ZELLEN ZUR HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN UND HUMANEM ANTITHROMBIN III.

Dissertation, Universität Bielefeld, Technische Fakultät, 8-9

Reuter, W., Köttgen, E., Bauer, C., Gerok, W. (1982)

BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF SIALIC ACIDS,

Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, Cell Biology Monograph, Schauer, R. (Edit.),

Springer, **10**, 5-50**Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, r., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988b)**

PRIMER-DIRECTED ENZYMATIC AMPLIFICATION OF DNA WITH THERMOSTABLE DNA POLYMERASE.

Science, **233**, 1076**Santell, L., Ryll, T., Etcheverry, T., Santoris, M., Dutina, G., Wang, A., Gunson, J., Warner, T. (1999)**

ABERRANT METABOLIC SIALYLATION OF RECOMBINANT PROTEINS EXPRESSED IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS IN HIGH PRODUCTIVITY CULTURE.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **258**, 132-37**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)**

MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 1

2. Aufl., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Kap. 5.62

Schauer, R. (1985)

SIALIC ACIDS AND THEIR ROLE AS BIOLOGICAL MASKS.

Trends Biochem. Sci., **10**, 357-60**Schmidt, T. (1998)**

PRODUKTION UND ANALYTIK VON PLASMID-DNA FÜR DIE GENTHERAPIE.

Dissertation, Universität Bielefeld, Technische Fakultät, 43-47

Shin, C. S., Hong, M. S., Bae, C. S., Lee, J. (1997)ENHANCED PRODUCTION OF HUMAN MINI-PROINSULIN IN FED-BATCH CULTURES AT HIGH CELL DENSITY OF *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3) [pET-3aT2M2].Biotechnol. Prog., **13**, 249-257**Smith, D. B., Johnson, K. S. (1988)**SINGLE-STEP PURIFICATION OF POLYPEPTIDES EXPRESSED IN *ESCHERICHIA COLI* AS FUSIONS WITH GLUTATHIONE S-TRANSFERASE.Gene, **67**, 31-40**Spellman, M. W. (1990)**

CARBOHYDRATE CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT GLYCOPROTEINS OF PHARMACEUTICAL INTEREST.

Anal. Chem., **62**, 1714-22**Stanley, P. (1992)**

GLYCOSYLATION ENGINEERING.

Glycobiology, **2**, 99-107

Svennerholm, L. (1957)

QUANTITATIVE ESTIMATION OF SIALIC ACIDS: A COLORIMETRIC RESORCINOL-HYDROCHLORIC ACID METHOD.

Biochim. Biophys. Acta, **24**, 604-611

Sweeley, C. C. (1993)

EXTRACELLULAR SIALIDASES.

Adv. Lip. Res., **26**, 235-52

Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T. W., Kubota, M., Wada, M., Shimizu, R., Hoshi, S., Kozutsumi, H., Takasaki, S., Kobata, A. (1989)

RELATIONSHIP BETWEEN SUGAR CHAIN STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN PRODUCED IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS.

Proc. Natl. Acad. Sci., **86**, 7819-22

Teige, M., Weidemann, R., Kretzmer, G. (1994)

PROBLEMS WITH SERUM-FREE PRODUCTION OF ANTITHROMBIN III REGARDING PROTEOLYTIC ACTIVITY AND PRODUCT QUALITY.

J. Biotechnol., **34**, 101-5

The Qiaexpressionist (1992)

Protocol 2, 33-34

Tuan, R. S. (Edit.) (1997)

RECOMBINANT GENE EXPRESSION PROTOCOLS.

Methods in Molecular Biology, **62**, Humana Press Inc. , Totowa, New Jersey, Kap. 1, 4

Varki, A. (1992)

DIVERSITY IN THE SIALIC ACIDS.

Glycobiology, **2**, 25-40

Varki, A. (1993)

BIOLOGICAL ROLES OF OLIGOSACCHARIDES: ALL OF THE THEORIES ARE CORRECT.

Glycobiology, **3**, 97-130

Varki, A. (Edit.), Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999a)

ESSENTIALS OF GLYCOBIOLOGY.

Cold Spring Harbor Laboratory, Kap.3.32

Varki, A. (Edit.), Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999a)

ESSENTIALS OF GLYCOBIOLOGY.

Cold Spring Harbor Laboratory, Kap.1.9

Warner, G. W., Chang, J., Ferrari, J., Harris, R., McNerney, T., Bennett, G., Burnier, J., Sliwowski, M. B. (1993)

ISOLATION AND PROPERTIES OF A SOLUBLE SIALIDASE FROM THE CULTURE FLUID OF CHINESE HAMSTER OVARY CELLS.

Glycobiology, **3**, 455-63

Warner, T. (1999)

ENHANCING THERAPEUTIC GLYCOPROTEIN PRODUCTION IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS BY METABOLIC ENGINEERING ENDOGENOUS GENE CONTROL WITH ANTISENSE DNA AND GENE TARGETING.

Glycobiology, **9**, 841-50

Watson, E., Bhide, A., van Halbeek, H. (1994)

STRUCTURE DETERMINATION OF THE INTACT MAJOR SIALYLATED OLIGOSACCHARIDE CHAINS OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN EXPRESSED IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS.

Glycobiology, **4**, 227-237

Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A., Olins, P. O. (1996)

OPTIMIZATION OF HETEROLOGOUS PROTEIN PRODUCTION IN *ESCHERICHIA COLI*.

Curr. Opin. Biotechnol., **7**, 494-499

Yang, M., Buttler, M. (2000)

EFFECT OF AMMONIA ON THE GLYCOSYLATION OF HUMAN RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN IN CULTURE.

Biotechnol. Prog., **16**, 751-59

Yang, Q-H., Wu C-L., Lin, K., Li, L. (1997)

LOW CONCENTRATION OF INDUCER FAVORS PRODUCTION OF ACTIVE FORM OF 6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE / FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE IN *ESCHERICHIA COLI*.

Prot. Expr. Purif., **10**, 320-324

Young Jr., W. W., Portoukalian, J., Hakomori, S. (1981)

TWO MONOCLONAL ANTICARBOHYDRATE ANTIBODIES DIRECTED TO GLYCOSPHINGOLIPIDS WITH A LACTO-N-GLYCOSYL TYPE II CHAIN.

J. Biol. Chem., **256**, 10967-72

Zettlmeissl, G., Ragg, H., Karges, H. E. (1987)

EXPRESSION OF BIOLOGICALLY ACTIVE HUMAN ANTITHROMBIN III IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS.

Bio/Technology, **5**, 720-725

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Quellen benutzt habe.

Bielefeld, im März 2001

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Monika Burg
Anschrift:	Splittenbreite 5, 33613 Bielefeld
Telefon:	0521-893025
Geburtsdatum und -ort:	03.12.1965 in Bad Oeynhausen
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:

1972 - 1976	Grundschule Vlotho
1976 - 1986	Wesergymnasium Vlotho
	Abschluß: Abitur

Hochschulstudium:

Okt. 1986 - Juni 1993	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld,
Okt. 1991 - Mai 1993	Biologie Diplom Diplomarbeit: Durchführung an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld, AG Zellkulturtechnik, Leitung: Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann; Thema: Die Wirkung von Cholesterol und Cholesterylestern auf Wachstum und Produktivität einer Hybridomazelllinie.
Okt. 1993 - April 1995	Studium der Biologie und Chemie (Lehramt, Sek. I)

Promotion:

April 1995 - Sep. 1999	Dissertation an der Universität Bielefeld, Technischen
März 2000 - April 2000	Fakultät, AG Zellkulturtechnik,
Jan. 2001 - März 2001	Leitung: PD Dr. J. Müthing Thema: Molekulare Charakterisierung einer in <i>Escherichia coli</i> exprimierten cytosolischen Sialidase aus CHO-Zellen
April 1995 - April 1998	Vorsitzende der Stipendiaten des DFG Graduiertenkollegs; Tätigkeiten: Planung und Organisation von Exkursionen, Weiterbildungsmaßnahmen und Vortragsreihen.

Okt. 1999 - Feb. 2000

Wissenschaftliche Angestellte der AG Zellkulturtechnik,
Technische Fakultät, Universität Bielefeld,
Leitung: Akad. O. Rat Dr. H. Büntemeyer;
Durchführung des Projektes: Adaption einer
rekombinanten CHO-Zelllinie an serumfreie
Kulturbedingungen, Kultivierung im SuperSpinner und
im 2 Liter Bioreaktor mit Membranbegasung und
Entwicklung eines enzymatischen Testsystems zur
Produktkontrolle.

Mai 2000 - Dez. 2000

Wissenschaftliche Angestellte der Gesellschaft zur
Förderung des Forschungs- und Technologietransfers in
der Universität Bielefeld e. V.,
Leitung: HD Dr. J. Müthing;
Durchführung des Projektes: Kultivierung einer
Suspensionszelllinie, adhärenter Zelllinien sowie primärer
Endothelzellen auf Microcarriern im SuperSpinner.

